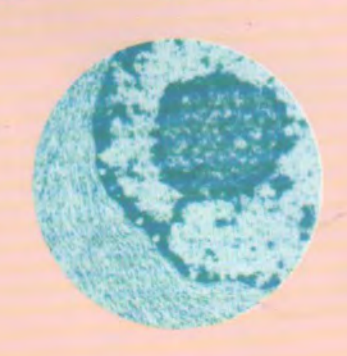


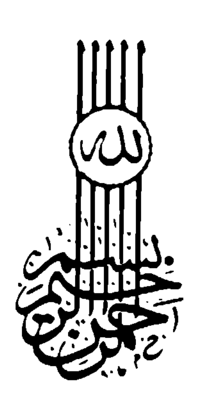
المجاهر وتقنياتها

الدكتور محمد بن صالح الخليفة
الدكتور عبدالعزيز بن عبدالرحمن الصالح





جامعة الملك سعود
النشر العلمي والمطابع



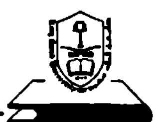
المجاهر وتقنياتها

تـأليـف

الدكتور محمد بن صالح الخليفة
أستـاذ

الدكتور عبدالعزيز بن عبدالرحمن الصالح
أستـاذ

قسم علم الحيوان ـ كلية العلوم ـ جامعة الملك سعود



عمـادة شـؤون المكتبـات ـ جامعـة الملك سعـود

ص.ب ٢٢٤٨٠ الرياض ١١٤٩٥ ـ المملكة العربية السعودية

الطبعة الأولى : ١٤٠٧هـ (١٩٨٧م)
الطبعة الثانية : ١٤١٦هـ (١٩٩٥م)
الطبعة الثالثة : ١٤٢٩هـ (٢٠٠٨م)

فهرسة مكتبة الملك فهد الوطنية في أثناء النشر

الخليفة، محمد بن صالح
المجاهر وتقنياتها / محمد بن صالح الخليفة، عبد العزيز بن عبدالرحمن الصالح — ط٣.- الرياض، ١٤٢٩هـ
٣٧٨ ص ١٧ × ٢٤سم
ردمك : ٤- ٣٢١ - ٥٥ — ٩٩٦٠-٩٧٨
١- الميكروسكوبات. أ. الصالح، عبدالعزيز بن عبدالرحمن (مؤلف مشارك). ب . العنوان.
ديوى ٥٣٥,٣٣٢ ١٤٢٩/٢٧٤٦

رقم الإيداع : ١٤٢٩/٢٧٤٦
ردمك : ٤- ٣٢١ - ٥٥ — ٩٩٦٠-٩٧٨

حكمت هذا الكتاب لجنة متخصصة شكلها المجلس العلمي بالجامعة، وقد وافق المجلس على نشره في اجتماعه الثاني الذي عقد بتاريخ ١٤٠٦/١/٨هـ الموافق ١٩٨٥/٩/٢٢م، ثم وافق المجلس على إعادة طباعته في اجتماعه الرابع والعشرين للعام الدراسي ١٤١٦/١٤١٥هـ الذي عقد بتاريخ ١٤١٦/١/٢٠هـ الموافق ١٩٩٥/٦/١٨م، ثم وافق المجلس على إعادة طباعته في اجتماعه الحادي عشر للعام الدراسي ١٤٢٨/ ١٤٢٩هـ المعقود بتاريخ ١٤٢٩/٢/٢٤هـ الموافق ٢٠٠٨/٣/٢م.

النشر العلمي والمطابع ١٤٢٩هـ

تقديم للطبعة الثالثة

الحمد لله وحده والصلاة على من لا نبي بعده ، نبينا محمد وعلى آله وصحبه ومن سار على دربه إلى يوم الدين وبعد..

ونحن إذ نشكر المولى عزّ وجل دائما على توفيقه لنا في إعداد هذا الكتاب ، نشكره على ما حظي به الكتاب ايضا من إقبال ليس من قبل طلاب جامعة الملك سعود فقط بل ومن قبل طلاب جامعات المملكة العربية السعودية بشكل خاص ومن قبل طلاب الجامعات العربية بشكل عام ، حيث أن هذا الكتاب إنفرد باسلوب سهل مبسّط جعل الاستفادة منه نظريا وتطبيقيا أمرا ميسورا ولهذا الغرض ألف هذا الكتاب.

وأخير ، نتوجه بالشكر الجزيل إلى كل من ساهم في تسهيل أخراج وطباعة هذا الكتاب ونخص بالشكر العاملين في النشر العلمي والمطابع بجامعة الملك سعود على ما بذلوه من جهود في هذا الخصوص .

المؤلفان

المقدمة

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف الأنبياء والمرسلين نبينا محمد وعلى آله وصحبه أجمعين وبعد . .

نتوجه بخالص الدعاء إلى الله خالق السموات والأرض أن يجد شبابنا الجامعي في هذا الكتاب ما يصبون إليه من علم نافع يساعدهم في المساهمة على تطوير علوم الحياة، فعليهم تُعلَّق الآمال في النهوض بالحركة التعليمية في بلادنا العربية .

ولقد حاولنا في هذا الكتاب أن نتبع أسلوبًا مبسطًا في الكتابة عن طبيعة المجاهر، ومفهوم التحضيرات المجهرية الدقيقة مع شرح وافٍ مدعمٍ برسومات تخطيطية كي يتسنى للطالب الجامعي إدراك أهمية هذا العلم والاستفادة منه نظريًا وتطبيقيًا في تقصى أسرار الكائنات الحية . فمن المعروف أن المجاهر وتقنياتها قد أصبحت اليوم الركيزة الأساسية للكشف والتحري عن كيفية تشكل جسم الكائن الحي ، وكذلك قيامه بوظائفه الحيوية المختلفة . فقد أدرجنا في هذا الكتاب ثلاثة أبواب رئيسة، خصصنا الأول منها للمجاهر الضوئية وطرق تحضيراتها، والثاني للمجاهر الإلكترونية وتحضيراتها، أما الثالث فيشمل المواد والمحاليل الكيميائية المستخدمة في عمليات التحضيرات الدقيقة . كما زودنا الكتاب بخمسة ملاحق نعتقد أنها مكملة لموضوعات هذا الكتاب .

وقد أحسسنا بالغبطة والفرح عندما انتهينا من إعداد هذا الكتاب ، وبلغتنا العربية

التي خصّها الله وجعلها لغة القرآن الكريم، كما يسرنا أن نقدم إلى أجيال الجامعة قليلاً من سطور المعرفة وبلغتهم البليغة. ومما لا شك فيه أن التقدم العلمي في بلادنا العربية يعتمد اعتمادا كليا على ما يكتب بلغتنا الأصيلة، وهذا ما يضمن سرعة الفهم ودقته مع المحافظة على التراث العربي العريق.

ونحن دائما نشكر المولى عزّ وجل على توفيقه لنا في إعداد هذا المرجع الدراسي، والذي هو حصيلة خبرة تدريسية وتطبيقية في هذا المجال، سائلين الباري أن يجعل منه النفع الكثير لطلاب جامعة الملك سعود خاصة، وطلاب الجامعات العربية عامة إنه على ذلك لقدير.

وأخيراً، لا يسعنا إلا الرجاء الصادق من ذوي العلم والخبرة أن يتكرموا بتقديم النصح والتوجيه لنا حتى نتدارك ما فات عن غير قصد في طبعة ثانية لما في ذلك من خير لمصلحة شبابنا وحتى يحظى برضى طلاب المعرفة.

المؤلفـــان

المحتويات

صفحة

صفحة

قائمة الأشكال

صفحة

صفحة

صفحة

صفحة

صفحة

الأشكال المرفقة بالملاحق

صفحة

قائمة الجداول

صفحة

الباب الأول

المجاهر الضوئية

- لمحة عن البصريات
- المجاهر الضوئية البسيطة
- المجاهر الضوئية المركبة
- طرق التحضير المجهرية
- أصباغ الأنسجة
- التصوير الإشعاعي الذاتي

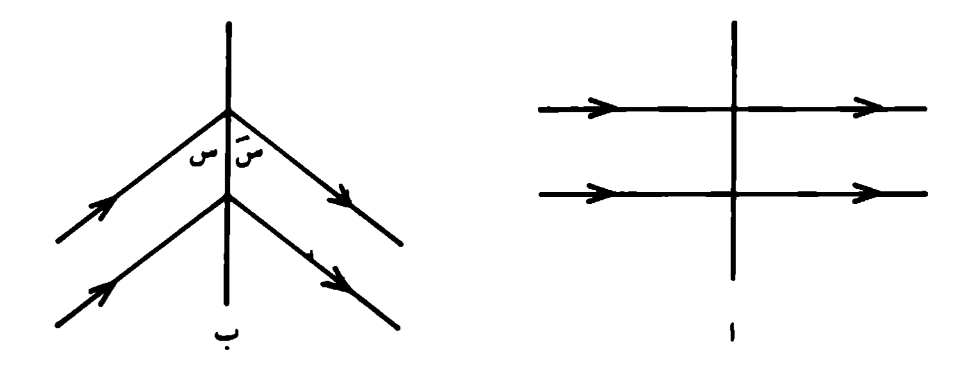
الفصل الأول

لمحة عن البصريات

● مقدمة ● تكون الصور وتكبيرها بالعدسات البسيطة ● تكون الصور وتكبيرها بالعدسات المكبرة.

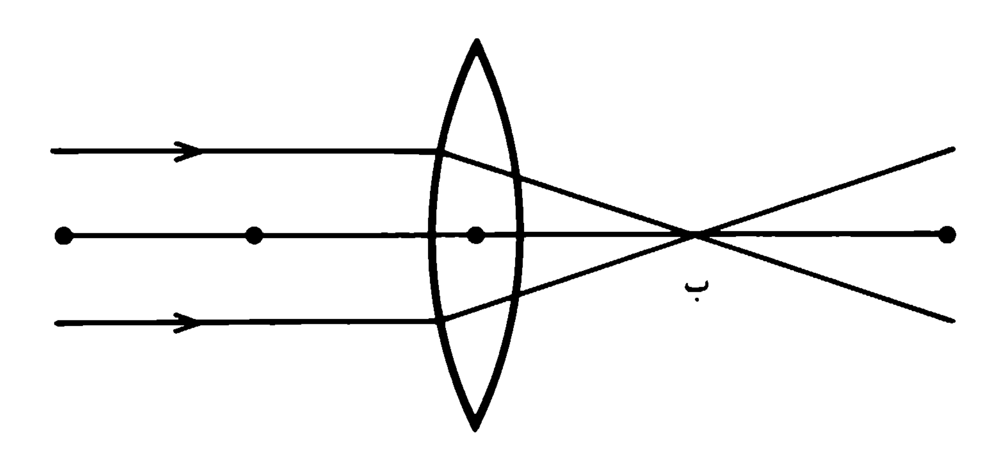
مقدمة

معروف أن الضوء ينتقل في الفراغ (Vacuum) بسرعة ثابتة. لكنه إذا انتقل خلال وسط معين كالهواء أو الماء أو الزجاج فإن سرعته تتغير. وكل وسط ينتقل فيه الضوء بسرعة معينة. وتعرف العلاقة بين سرعة الضوء في الفراغ وفي أي وسط آخر بمعامل الانكسار (Refractive index) (معامل الانكسار = سرعة الضوء في الفراغ ÷ سرعته في الوسط الآخر). الحقيقة، إن سرعة الضوء في الهواء قريبة جداً من سرعته في الفراغ ولذا يعتبر معامل الانكسار للهواء مساويا للواحد لكن معامل الانكسار للزجاج عادة يساوي ١,٥، ولذا نجد أن سرعة الضوء في الزجاج تكون بطيئة. ومن المعروف أن أشعة الضوء تنكسر عندما تنتقل بين وسطين لكل منهما معامل انكسار يختلف عن الآخر. ويعتمد هذا على شيئين هما معامل الانكسار والزاوية التي يصطدم عندها الشعاع بالوسط الثاني. لكن عندما تسقط أشعة الضوء عموديا على الوسط فإنه لا يحدث لها أي انكسار بل تستمر على نفس المسار (شكل ١ ـ ١) وعندما تسقط هذه الأشعة على الوسط بزاوية معينة تقل عن الزاوية القائمة فإن مسار الأشعة سوف ينكسر

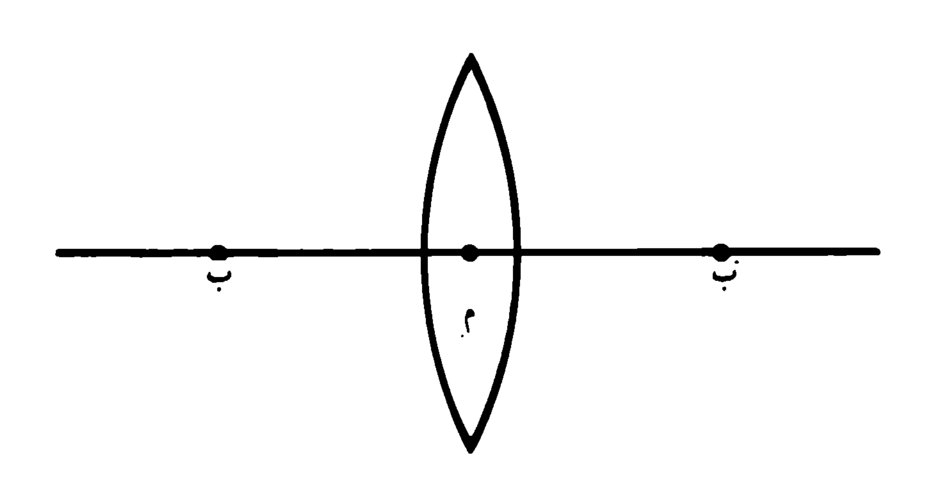


شكل ١ ـ ١ : العلاقة بين زاوية سقوط الشعاع وانكساره
ا ـ زاوية قائمة.
ب ـ زاوية حادة.

خلال الوسط الثاني بنفس زاوية السقوط تقريبا، وكلما نقصت زاوية السقوط (س) كلما نقصت زاوية الانكسار (سَ) وبنسبة ثابتة تعادل معامل الانكسار (س = م) ودائما تكون زاوية السقوط أكبر قليلا من زاوية الانكسار (شكل ١ ـ ١)، لكن عندما تسقط أشعة ضوئية متوازية على سطح عدسة زجاجية محدبة فإن هذه الأشعة المتوازية سوف تسقط على سطح العدسة المحدب بزوايا مختلفة نظرا للتحدب. يعني هذا أن زوايا الانكسار سوف تكون هي الأخرى مختلفة مما يؤدي إلى تلاقي هذه الأشعة في نقطة معينة تعرف بالبؤرة (شكل ١ ـ ٢). وتعرف المسافة الفاصلة بين البؤرة (ب) والمركز البصري للعدسة (م) باسم البعد البؤرى ويساوي نصف قطر الكرة التي قطعت منها العدسة (ب م = نق/٢)، أي أن العدسة المقطوعة من الكرة الصغيرة لها بعدا بؤريا قصيرا والعكس صحيح (شكل ١ ـ ٣).



شكل ١ ـ ٢ : العلاقة بين الأشعة المتوازية والعدسة المحدبة .
ب : البؤرة



شكل ١ ـ ٣ : البعد البؤري للعدسة المحدبة .
ب : البؤرة م : المركز

تكوُن الصور وتكبيرها بالعدسات البسيطة

لكي نفهم كيفية تكون الصور وتكبيرها بالعدسات لابد من معرفة الحقائق الآتية :

١ ـ الشعاع الذي يسقط موازيا للمحور الرئيسي للعدسة ينكسر ماراً بالبؤرة (شكل ١ ـ ٤ ـ ١).

٢ ـ الشعاع الذي يسقط ماراً ببؤرة العدسة ينكسر موازيا لمحورها الرئيسي (شكل ١ ـ ٤ ـ ٢).

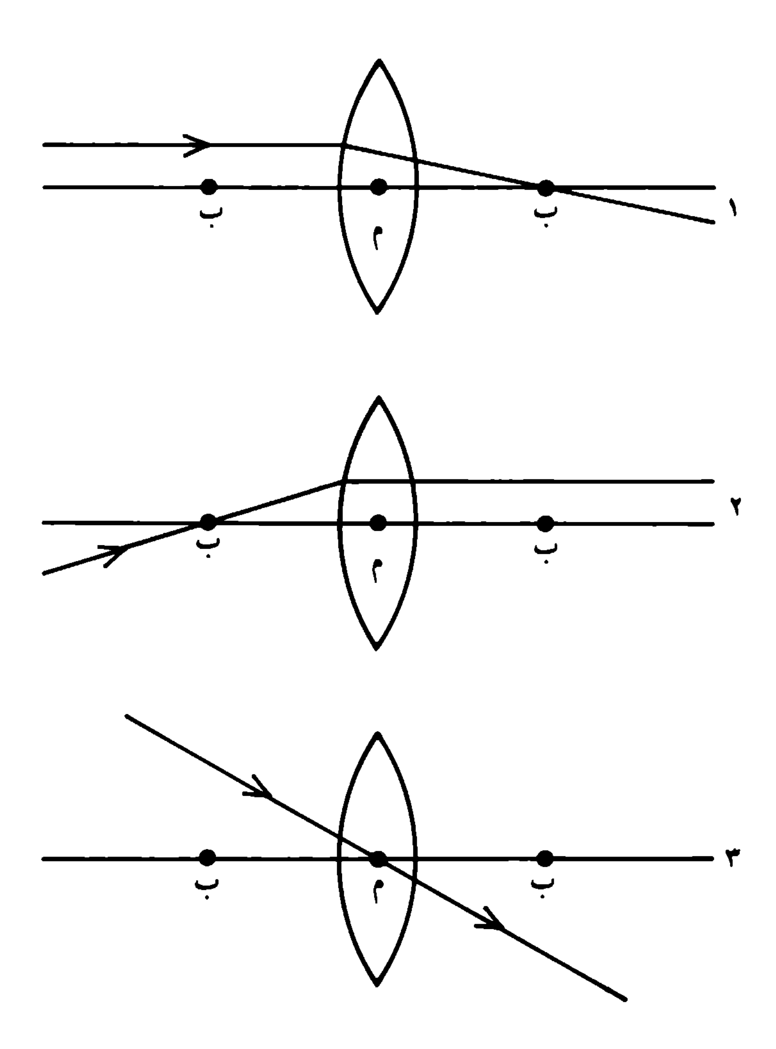
٣ ـ الشعاع الذي يسقط ماراً بالمركز البصري للعدسة لا ينكسر إطلاقًا (شكل ١ ـ ٤ ـ ٣).

كما يجب أيضا معرفة أن تتبع مسار أي شعاعين من الأشعة الثلاثة سابقة الذكر لكفيلان بتوضيح كيفية تكون الصورة والتكبير. تستطيع العدسة المحدبة أن تكون ست صور مختلفة لأي جسم تبعا لموقعه أمام هذه العدسة ومدى بعده أو قربه منها. لكن العدسة المحدبة تستطيع أن تكبر الجسم الموضوع أمامها في حالتين فقط، الأولى يقع الجسم فيها قبل البؤرة وتتكون له صورة خيالية معتدلة (Virtual image) ، أما الثانية فيجب أن يقع الجسم خلف البؤرة وبمسافة تقل عن ضعف البعد البؤرى، وفي هذه الحالة يتكون للجسم صورة حقيقية (Real image) مقلوبة مكبرة. وكلما قَرُبَ الجسم من البؤرة كلما زادت قوة تكبير الصورة (شكل ١ ـ ٥ ـ ١ ، ٢). وعندما يقع الجسم في البؤرة تماما عندها تتكون للجسم صورة تقع في اللانهاية (∞).

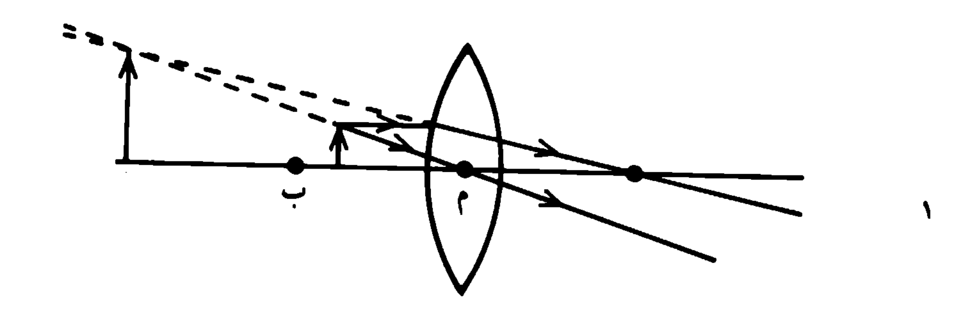
تكون الصورة وتكبيرها بالعدسات المركبة

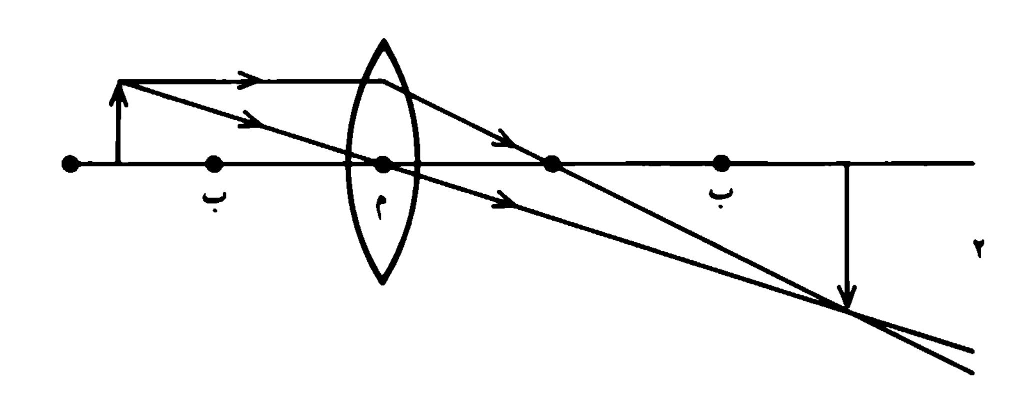
لقد استغلت قدرة العدسات البسيطة على تكوين صور مكبرة للأجسام في زيادة القوة التكبيرية وذلك باستخدام أكثر من عدسة بسيطة في آن واحد كما هي الحال في المجاهر المركبة (Compound microscopes). تعتمد الفكرة بشكلها المبسط على استخدام عدسة شيئية (Objective lens) يوضع أمامها الجسم المراد تكبيره وعدسة عينية (Ocular lens) ينظر من خلالها إلى الجسم المراد تكبيره. تتم عملية التكبير في مثل هذا

النظام بعد وضع الجسم أمام العدسة الشيئية وخلف بؤرتها ليتكون لهذا الجسم صورة حقيقية (صورة متوسطة Intermediate image) مقلوبة مكبرة، هذه الصورة المتوسطة يجب أن تقع أمام بؤرة العدسة العينية حتى تكون لها صورة مكبرة وخيالية (صورة نهائية Final image) ومعتدلة باستطاعة العين أن تراها في شكلها المكبر جداً (شكل ١ ـ ٦).

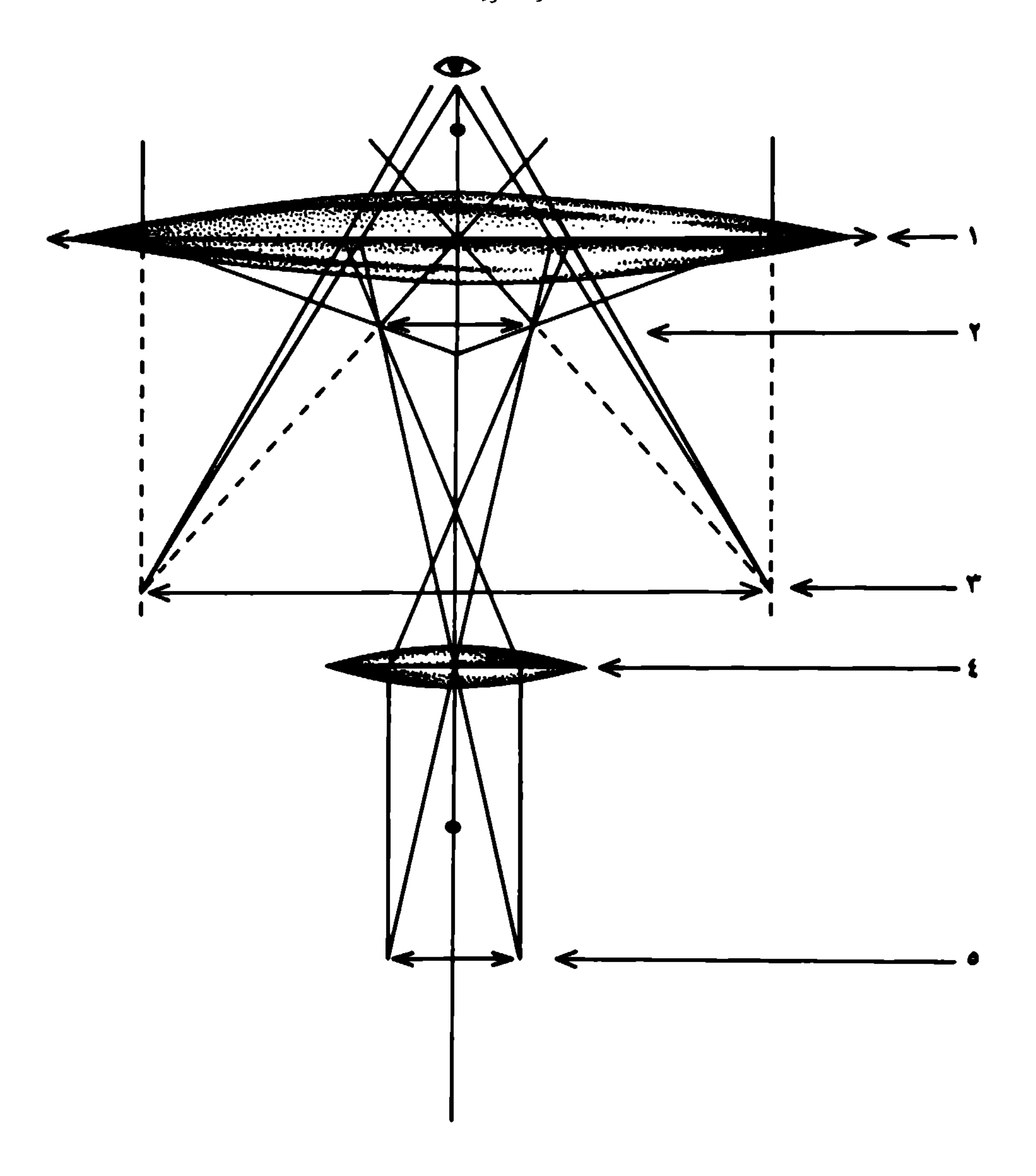


شكل ١ ـ ٤ : بعض حقائق الانكسار للعدسات المحدبة .





شكل ١ ـ ٥ : العلاقة بين التكبير والعدسة المحدبة .



شكل ١ ـ ٦ : التكبير في المجاهر المركبة.

(١) عدسة عينية، (٢) صورة (خيالية) وسطية، (٣) صورة (خيالية) نهائية، (٤) عدسة شيئية و(٥) الجسم أو العينـة.

المجاهر الضوئية البسيطة

● مقـدمـة ● تركيب المجهـر البسيط
● أنواع المجاهر البسيطة

مقـــدمة

جهاز التكبير (Magnification instrument) عبارة عن آداة علمية لها القدرة على تكبير وتوضيح العينات الصغيرة جداً وبالذات تلك التي يستحيل رؤيتها بالعين المجردة (Nacked-eye) ، مثل الخلايا الحيوانية أو النباتية. يعتمد جهاز التكبير في المقام الأول على الاستفادة من خاصية العدسات (Lenses) ومقدرتها على تكبير الأجسام إذ لا يخلو أي جهاز تكبير من وجود عدسة واحدة أو أكثر سواء كانت زجاجية أو كهرومغناطيسية كما هي الحال عليه في المجهر الإلكتروني.

أجهـزة التكبـير عديدة وتعـرف باسم المكـبرات (Magnifier) أو المجـاهـر (Microscopes) وتتفاوت فيما بينها من حيث الصنع لكن الوظيفة الرئيسية واحدة ألا وهي المساعدة على التعرف وتكبير الأجسام والعينات الصغيرة ومن ثم التعرف عليها.

تركيب المجهر البسيط

تعـرف المجـاهر الضوئية البسيطة باسم العدسات المكبرة (Magnifier lenses) ويعتمد هذا النمط من المكبرات على مصدر ضوئي طبيعي أو كهربائي.توجد عدة أنواع من

هذا النمط تختلف من حيث التصميم ولكنها جميعا تشترك في صفة أساسية واحدة وهي أن لها عدسة واحدة محدبة الوجهين. أما قوة تكبير هذه المجاهر البسيطة تكون في العادة محدودة وتتراوح ما بين ٥ إلى ٢٥ مرة. كما يعتبر العالم الهولندي لوفينهوك Antony Van Leeuwenhoek(١٦٣٢ - ١٧٣٣) من النابغين في صناعة المجاهر حيث استطاع أن يصنع مجهرًا بسيطًا ذا قوة تحليل جيدة مكنه من مشاهدة الكائنات البكتيرية الدقيقة والحيوانـات المنوية. ولقد كانت هواية لوفينهوك هي صقل العدسات ومنها تمكن من صنـع مجهره البسيط، والذي يتكون من عدسة محدبة واحدة مثبتة على صفيحة من النحاس وبها دبوس تغرز به العينة المراد فحصها وبالإمكان التحكم في وضع الدبوس بوساطة لولب قابل للتحريك (شكل ٢ - ١). وعلى الرغم من أن المجاهر البسيطة لا تزال تستعمل حتى وقتنا الحاضر إلا أنها تمتاز بأنها تعطي صورا معتدلة وحقيقية للأشياء المراد دراستها. كما أن الصورة المكبرة تكون عادة خالية من الزيغ اللوني أو الكروي إلا إذا كانت العدسة غير مصقولة جيدا فيلاحظ تجعدات وانحناءات واضحة في الصورة المتكونة. ولعل من أشهر عيوب هذه المجاهر البسيطة أنها تحتاج إلى تقريب وبشكل ملفت للعين، كما أن حقل الرؤية محدودا وهناك صعوبة في تحميل وإضاءة العينة المراد فحصها.

أنواع المجاهر البسيطة

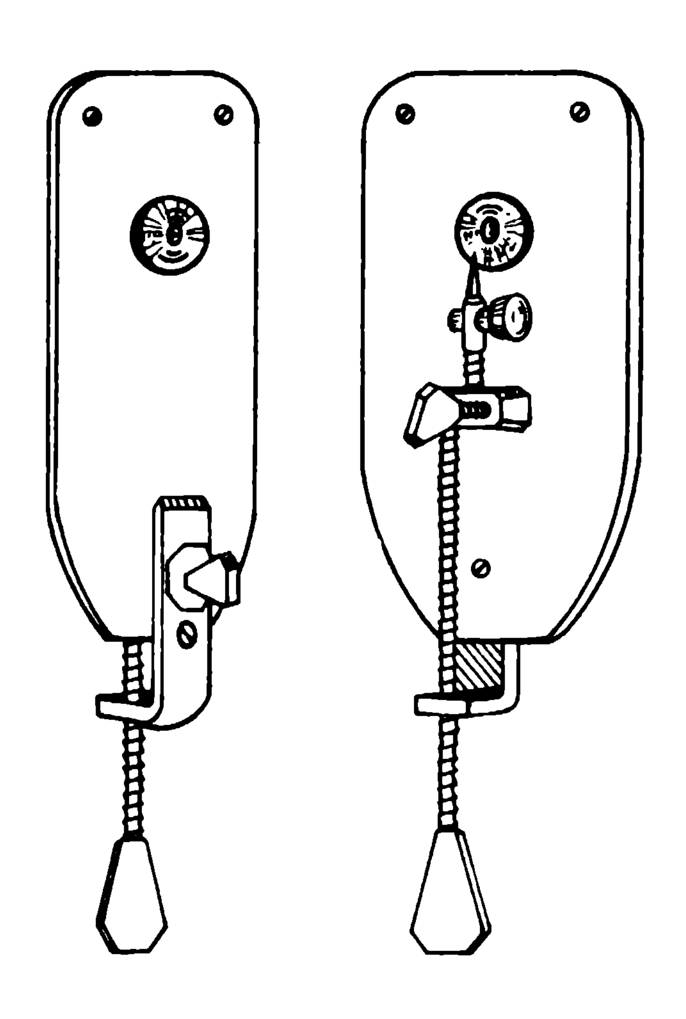
إن اسم المجاهر البسيطة ليس شائع الاستعمال في العصر الحديث فقد استبدل بالمكبرات. ويوجد منها أنواع عديدة متباينة من حيث الشكل وكيفية الصنع لكنها تجمع صفـة أسـاسية واحدة وهي أنها تملك عدسة محدبة واحدة فقط. من أشهر المجاهر البسيطة المستعملة في الحياة اليومية ما يلي:

١ - مجهر ليوفينهوك — Leeuwenhoek microscope
٢ - عدسة الساعاتي — Watch-maker lens (Loupe lens)
٣ - عدسة الجيب — Pocket lens
٤ - عدسة اليد — Hand lens
٥ - عدسة الطاولة — Table lens

٦ ـ المصباح المكبر Torch-magnifier

١ ـ مجهر ليوفينهوك

يعتبر بمثابة أول مجهر بسيط استعمل في الدراسات الحيوية ولقد سبق الإشارة إليه (ص ١٢).



٢ ـ عدسة الساعاتي

عبارة عن عدسة مستوية محدبة (Plano-Convex) لا يزيد قطرها عن ٢٥ مم، كما أن قوة تكبيرها قد تصل إلى خمس مرات (X5). هذه العدسة تكون عادة مثبتة في أنبوب بلاستيكي ذا قطر يبلغ ٢٥ مم عند القمة وحوالي ٣٠ مم عند القاعدة (شكل ٢ ـ ٢). ويعرف هذا النوع من المجاهر باسمه التجاري «عدسة الساعاتي» نظرا لاستخدامه من قبل صانعي الساعات أثناء الاصلاح. حيث يثبت بين حاجب العين وجفن العين السفلى وبذلك يستطيع الساعاتي حل أو ربط ضوابط الساعة بشكل دقيق.



شكل ٢ ـ ٢ عدسة الساعاتي

٣ ـ عدسة الجيب

هذا المجهر البسيط يتكون عادة من عدسة واحدة محدبة الوجهين (Bi-convex lens) يتراوح قطرها من ٨ إلى ٤٥ مم وتحمل في إطار من البلاستيك الصلب أو المعدن (شكل ٢ ـ ٣). وعادة ما يُزود بغطاء أو غلاف من الجلد أو المعدن المطلي بالكروم لغرض حماية العدسة من الخدش أو الكسر. وتتراوح قوة التكبير فيه من ٥ ـ ١٥ مرة. قد يوجد أحيانا أكثر من عدسة جيب في إطار واحد ذات قوى تكبير متفاوتة. وهذا النوع من المجاهر مفيد جدا في الرحلات الحقلية حيث يساعد في التعرف المبدئي على العينات الحيوية أو الجيولوجية.



٤ ـ عدسة اليد

هذا النوع من المجاهر يشبه إلى حد كبير عدسة الجيب إلا أنها عدسة عادة ما تمتاز بوجود قطر أكبر يتراوح من ٤٥ ـ ١٠٠ مم وقوة تكبير قد تصل إلى ١٥ مرة. كما يزود هذا المجهر بمقبض طويل ومن هنا جاءت التسمية بعدسة اليد (شكل ٢ ـ ٤).



٥ ـ عدسة الطاولة

هذا نوع آخر من المجاهر البسيطة أو المكبرات وتمتاز عدسة الطاولة بأنها محدبة الوجهين ذات قوة تكبير تتراوح من ٢ ـ ١٥ مرة. وعدسة الطاولة هي عدسة كبيرة نسبيا قد يصل قطرها أحيانا إلى ١٠٠ مم أو أكثر كما تزود بذراع قابل للثني، وقاعدة ثقيلة يصل قطرها إلى ١٥٠ مم تقريبا. وقد يزود مثل هذا النوع من العدسات بإضاءة صناعية (شكل ٢ ـ ٥).



شكل ٢ ـ ٥ : عدسة الطاولة.
ا ـ غير مضاءة، و ب ـ مضاءة.

٦ ـ المصباح المكبر

هذا المجهر البسيط يشبه تماما المصباح اليدوي حيث يزود ببطاريات جافة وعدسة محدبة الوجهين ومصباح (لمبة) إضاءة مما يسهل عملية الفحص (شكل ٢ ـ ٦).



شكل ٢ ـ ٦ : المصباح المكبر.

الفصل الثالث

المجاهر الضوئية المركبة

● مقدمة ● تركيب المجهر المركب ● استعمال المجهر ● صيانة المجهر ● المجهر مظلم الحقل ● مجهر الطور المتباين ● المجهر الفلورسيني ● المجهر المقلوب ● المجهر متداخل الضوء

مقدمة

يعتبر هذا النمط من المجاهر أكثر تعقيدا من المجاهر البسيطة من حيث الصنع، كما يمتاز بقوى تكبير أعلى. تتباين المجاهر الضوئية المركبة فيما بينها كثيرا من حيث الصنع لكنها جميعا تشترك في صفة جوهرية واحدة وهي أن لها جهازًا بصريًّا مكبراً مكونًا من نوعين من العدسات، النوع الأول منها يعرف باسم العدسات الشيئية (Objective lenses) وهي التي تكون دوما بالقرب من الشيء المراد فحصه. أما النوع الثاني من العدسات فيعرف بالعدسات العينية (Ocular lenses) وهي التي تنظر العين من خلالها. وعلى العموم فمسميات المجاهر الضوئية المركبة عديدة لكن من أبرزها ما يلي:

ا - المجهر مضيء الحقل Bright-field microscope

ب - المجهر مظلم الحقل Dark-field microscope

جـ - مجهر الطور المتباين Phase-contrast microscope

د - المجهر الفلورسيني Fluorescence microscope

هـ - المجهر المقلوب Inverted microscope

و - مجهر متداخل الضوء Interference light microscope

وقبـل التحـدث عن طبيعة المجاهر سابقة الذكر يستحسن أن نذكر بشيء من التفصيل تركيب واستعـمال وصيانـة المجهـر المـركب (Compound microscope) أو مايعـرف أحيانـا بالمجهـر مضيء الحقل، فهذا النوع من المجاهر يعتبر بمثابة المثال النموذجي للمجاهر بشكل عام.

يمكن تجزئة المجهر الضوئي المركب من حيث التركيب إلى ثلاث مجموعات هي:

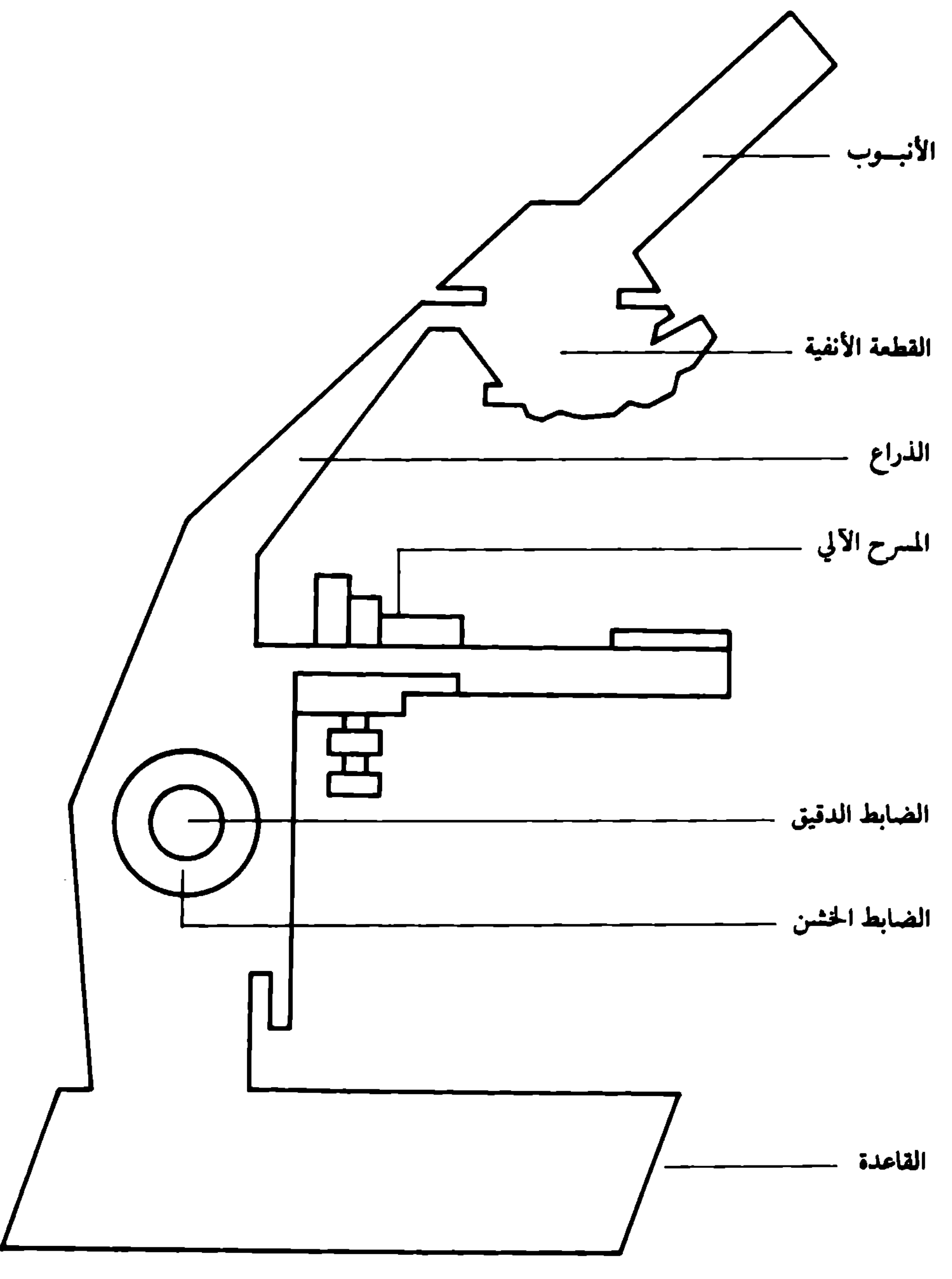
جهاز الحمل والتحريك Mounting and movement system

جهاز التكبير Magnification system

جهاز الإضـاءة Illumination system

جهاز الحمل والتحريك Mounting and Movement System

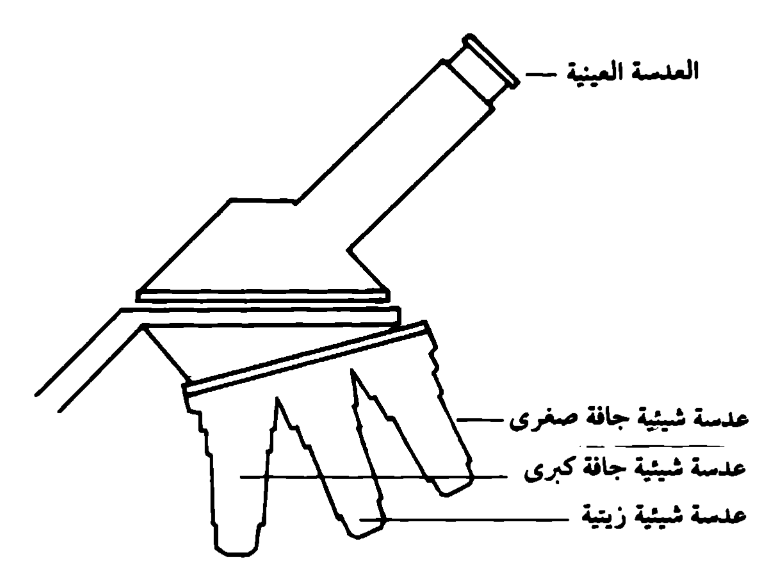
هذا الجهـاز عبـارة عن مجموعة من القطع المعدنية تحمل وتدعم أجهزة التكبير والإضاءة ويتركب من قاعدة (Base) يرتكز عليها المجهر وحامل أو ذراع (Arm) يمتد أفقيا ويشبه حرف (C) ويتصل به قطعة معدنية مربعة وأحيانا دائرية تعرف باسم المسرح (Stage)، كما يتصل بالذراع وفي نهايته العلوية قطعة معدنية مستديرة قابلة للدوران تعرف بالقطعة الأنفية (Noise-piece) والتي بدورها تحمل انبوبا (Tube) معدنيا واحدا أو أكثر. كما يوجد على الذراع ضوابط التحريك (Movement controls) يتم بوساطتها التحكم في رفع أو خفض مسرح المجهر بشكل سريع من خلال تحريك الضابط الخشن (Coarse control) وبشكل لطيف من خلال تحريك الضابط الدقيق (Fine control). أما المسرح فهو عبارة عن تلك القطعة المعدنية التي توضع عليها الشريحة المجهرية المراد فحصها وتمتاز باحتوائها على ثقب مركزي يسمح للضوء بالمرور خلال العينة المدروسة. كما يمتـاز المسرح باحتوائه على جهاز آلي محرك يتم بوساطته تحريك الشريحة وبشكل دقيق ـ مثل هذا المسرح المحرك يعرف بالمسرح الآلي (Mechanical stage) (شكل ٣ ـ ١).



شكل ٣ - ١ جهاز الحمل والتحريك للمجهر الضوئي المركب (عن ترابسة وزملائه [illegible] بتصرف).

جهاز التكبير Magnification System

يتكون جهاز التكبير في المجهر من مجموعة من العدسات الزجاجية المكبرة، لكنه بشكل عام يمكن تصنيفه إلى نوعين من العدسات، العدسات العينية (Ocular-lenses) وهي تلك العدسات التي تنظر العين من خلالها، والعدسات الشيئية (Objective lenses) أو تلك العدسات التي تكون قريبة من الشيء المراد فحصه (شكل ٣ - ٢).

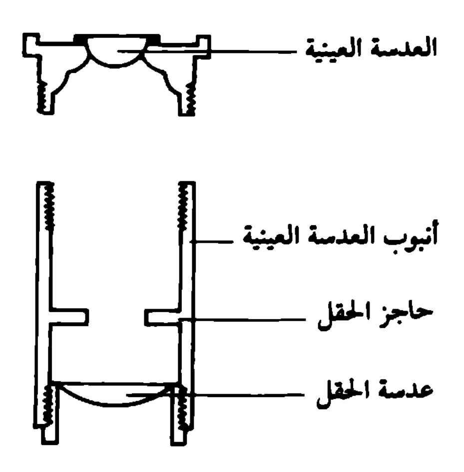


شكل ٣ - ٢ : جهاز التكبير في المجهر الضوئي. (عن ترايب وزملائه، ١٩٧٥)

العدسة العينية

وهي عبارة عن أنبوب قصير طوله حوالي ٤ سم وقطره حوالي ٢,٥ سم ويعرف بأنبوب العدسة العينية (Eye-piece tube). كما يوجد حاجز داخلي في وسط أنبوب العدسة العينية ذو فتحة مركزية تحد من مجال رؤية الحقل ويبلغ قطره حوالي ٨ مم ويعرف باسم الحجاب الحقلي (Field diaphragm). كما يوجد أيضا عند قمة هذا الأنبوب عدسة صغيرة محدبة مستوية (Plano-convex lens) هي عدسة العين

(Eye lens) ، وعند نهاية الأنبوب توجد عدسة أخرى محدبة مستوية تعرف بعدسة الحقل (Field lens) (شكل ٣ ـ ٣).



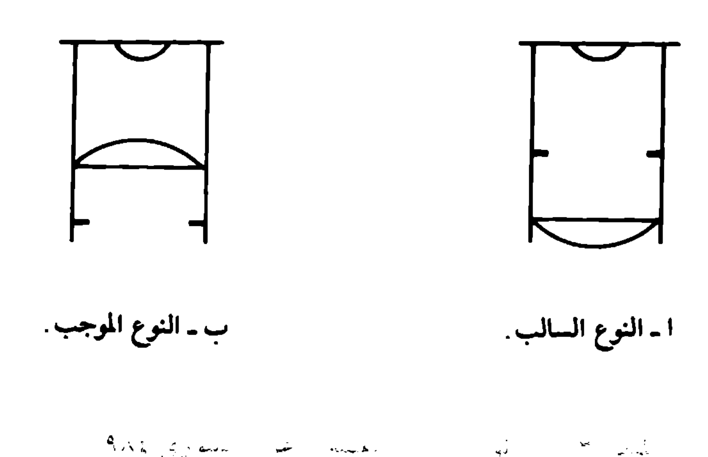
شكل ٣ ـ ٣: الشكل العام للعدسة العينية. (عن ترايب وزملائه، ١٩٧٥ بتصرف)

ويمكن تصنيف العدسات العينية المعروفة في الوقت الحاضر إلى نوعين رئيسيين هما:

النوع السالب Negative type

النوع الموجب Positive type

في النوع الأول أو السالب من العدسات العينية نجد أن السطح المحدب لكل من عدسة العين وعدسة الحقل دائما يكون باتجاه العدسات الشيئية، وأن الحاجب الحقلي يوجد بين هاتين العدستين (شكل ٣ ـ ١٤). أما النوع الثاني أو الموجب والذي يستخدم عادة مع العدسات الشيئية عالية التكبير، نجد أن السطحين المحدبين لكل من عدسة العين وعدسة الحقل متقابلان للداخل وأن الحاجب الحقلي للعينية يكون أسفل العدسة الحقلية (شكل ٣ ـ ٤ب).



ا ـ النوع السالب.

ب ـ النوع الموجب.

وكما هو معروف أن العدسة العينية تقوم بتكبير إضافي لتفاصيل الصورة الأولية (Primary image) التي تكبرها العدسة الشيئية. لهذا تبدو الصورة الفعلية واضحة للعين بشكل مفصل يمكن من دراستها بكل يسر. كما أن العدسات العينية الحديثة تمتاز بتعديلات محسوبة وبشكل دقيق لكي تصحح أي زيغ بصري ثانوي قد يطرأ على الصورة الأولية، وهذا يزيد من وضوح وتفاصيل الصورة النهائية، وبالإمكان إضافة مؤشر أو قرص مدرج أو حجاب مُحَدِّد (Limiting diaphragm) إلى العدسة العينية بشرط أن تقع هذه الأشياء في نفس المستوى الذي تتكون فيه الصورة الأولية لكي تظهر بنفس الوضوح التي تظهر عليه العينة المدروسة. إن إمكانية إضافة مثل تلك الأشياء الى العدسة العينية لها أهميتها في عمليات القياس والتدريس. والجدير بالذكر أن بعض العدسات العينية الحديثة قد أدخل عليها بعض التطوير لكي تعطي ما يعرف بنقطة العين العالية، وهي تلك النقطة التي يتجمع فيها مخروط الأشعة الخارج من العدسة العينية في بؤرة العين. هذا النوع من العدسات مفيد جدا للأشخاص لابسي النظارات حيث تزود مثل هذه العينيات بضابط دقيق يسهل تبئير الأشعة الخارجة منها مع بؤرة عين الفاحص دون الحاجة إلى خلع النظارات.

العدسات الشيئية

العدسات الشيئية (Objective lenses) عبارة عن أنابيب تتفاوت كثيرا فيما بينها من حيث الطول وقوة التكبير. وتوجد دائما مثبتة على القطعة الأنفية للمجهر. تصنف العدسات الشيئية إلى ثلاثة أنواع، عدسات شيئية منخفضة التكبير (Low-power objectives) وتتراوح قوة تكبيرها من ٢ إلى ١٠ مرات، وعدسات شيئية عالية التكبير (High-power objectives) وهذه تتفاوت قوى تكبيرها بين ٤٠ إلى ٨٠ مرة. وهناك النوع الثالث من العدسات الشيئية والمعروفة باسم العدسات الشيئية الزيتية (Oil-immersion objectives) وهذه تتراوح قوى تكبيرها من ٦٠ إلى ١٠٠ مرة. الجدير بالملاحظة أن العدسة الشيئية كلما زادت قوة تكبيرها كلما صغرت عدساتها، وارتفعت جودتها، وزاد طولها وارتفع سعرها، وكذلك زاد الرقم العددي المكتوب عليها، وقصرت المسافة بين عدستها الأمامية والعينة المدروسة. كما تمتاز العدسات الشيئية عالية التكبير دائما بأن عدساتها الأمامية (Front lenses) تكون مركبة على زنبرك (Spring) طري وهذا لحمايتها والحد من تلفها بسرعة، وبالذات عندما تلامس الشريحة المجهرية بطريق الخطأ أثناء الاستعمال. كما أن الوظيفة الأساسية للعدسة الشيئية هي تكوين صورة خيالية وسطية مكبرة للجسم المدروس، والتي بدورها تُكبَّر مرة ثانية بوساطة العدسات العينية لتتكون لها صورة نهائية مكبرة. يكتب عادة على العدسة الشيئية أربع مدلولات حسابية مختلفة، الأرقام العليا تدل على قوة التكبير والقيمة العددية لفتحة العدسة ذاتها وتمثل الأرقام اليسرى قوة التكبير بينما الأرقام اليمنى تدل على القيمة العددية لفتحة العدسة. تُفصل الأرقام الدالة على قوة التكبير عن تلك الأرقام الدالة على القيمة العددية لفتحة العدسة بخط مائل (/). أما الأرقام السفلى فتدل على طول الأنبوب العيني ويمثل بالأرقام اليسرى، وأما الأرقام اليمنى فتدل على سمك غطاء الشريحة النهائي الواجب استعماله مع العدسة ذاتها. يفصل بين الأرقام الدالة على طول الأنبوب العيني والأرقام الدالة على سمك غطاء الشريحة بخط مائل أيضا (/). ويستثنى من ذلك العدسات الشيئية التي لا تزيد قوة تكبيرها عن عشر مرات، مثل هذه العدسات لا يكتب عليها سمك غطاء الشريحة الواجب استعماله. أما في حالة العدسة الشيئية الزيتية فدائما تستبدل الأرقام الدالة على سمك غطاء الشريحة بكلمة

زيت (Oil) للدلالة على أنه يجب استعمال الزيت مع هذه العدسة (شكل ٣ ـ ٥).



ا ـ عدسة زيتية، ب ـ عدسة شيئية منخفضة التكبير و جـ ـ عدسة شيئية عالية التكبير.

شكل ٣ ـ ٥ : نموذج لثلاثة أنواع مختلفة من العدسات الشيئية.

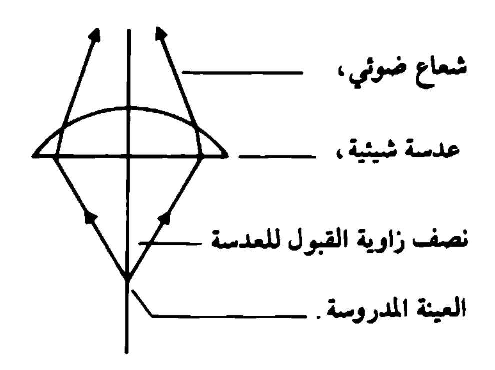
(عن ترايب وزملائه، ١٩٧٥ بتصرف)

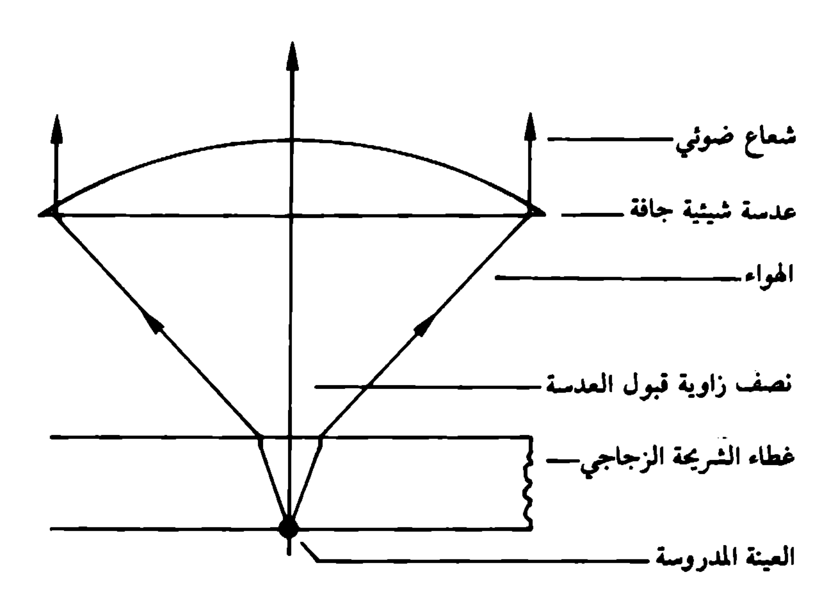
بالـطبـع تعتبر العدسة الشيئية من أهم مكونات المجهر نظرا لأنها المسؤولة عن تكوين الصورة الأولية للشيء، فلها القدرة على تحليل تفاصيله الدقيقة وكذلك تكبير هذا الشيء. يوجد العديد من العدسات الشيئية شائعة الاستعمال، كل نوع منها يمتاز ببعد بؤرى (Focal length) وقوة تكبير أساسية وفتحة عددية (Numerical aperture) مختلفة ويرمز للفتحة العددية بالرمز (N.A.).

الفتحة العددية للعدسة الشيئية تعادل حاصل ضرب جيب نصف زاوية قبول العدسة في معامل الانكسار للبيئة المستخدمة مع العدسة (شكل ٣ ـ ٦). ونظرًا لأن معامل الانكسار في الهواء يساوي (١)، إذاً الفتحة العددية تصبح مساوية لجيب نصف زاوية قبول العدسة. وبما أن القيمة العظمى لنصف زاوية قبول العدسة لا يزيد عن ٩٠°، ويعني هذا أن جيب الزاوية يساوي (١) وبالطبع سوف يكون هذا أكبر عدد يمكن أن تصل إليه الفتحة العددية للعدسات الشيئية الجافة (Dry objective lenses) عمليا القيمة العظمى للفتحة العددية للعدسات الشيئية الجافة عادة يكون في حدود ٠,٩٥ (شكل ٣ ـ ٧). أما العدسات الشيئية عالية التكبير كالعدسات الزيتية (Oil objective lenses) فتكـون الفتحة العددية عادة عالية وبالتقريب قد تصل إلى ١,٤ وهذا بالطبع يرجع إلى استخدام زيت ذي معامل انكسار يعادل معامل انكسار غطاء الشريحـة للضوء وبالتالي يزيد في زاوية قبول العدسة لعدم وجود انكسار للضوء بعد خروجه من غطاء الشريحة (شكل ٣ ـ ٨).

إن عملية استخدام عدسات شيئية ذات فتحات عددية عالية قد برهنت على وجود نقطة تحول في المجاهر الحيوية إذ بواسطتها أمكن الحصول على تفاصيل دقيقة للتراكيب الخلوية بشكل جيد.

حاليا معظم العدسات الشيئية قد أدخل عليها تصحيحات فيما يخص قواعد الزيغ أو الانحـراف الكروي واللوني والبؤري أو التقوس أو الغشاوة في الإضاءة الحقلية.

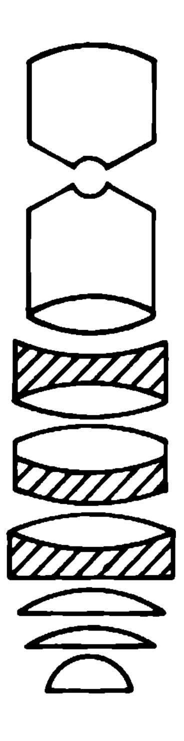

شعاع ضوئي،
عدسة شيئية،
نصف زاوية القبول للعدسة
العينة المدروسة.


شعاع ضوئي
عدسة شيئية جافة
الهواء
نصف زاوية قبول العدسة
غطاء الشريحة الزجاجي
العينة المدروسة

شعاع ضوئي
عدسة زيتية
زيت
نصف زاوية قبول العدسة
غطاء الشريحة الزجاجي
العينة المدروسة

وحتى تتم مثل هذه التصحيحات لابد من زيادة المكونات البصرية للعدسة الشيئية نفسها وبالذات كلما زادت قيمة فتحتها العددية. العدسة الشيئية مزدوجة العدسة سوف تعاني من انخفاض في قيمة الفتحة العددية (١,٠) أما العدسة الزيتية عالية الفتحة العددية والتي قد تصل إلى (١,٤) وبها العديد من العدسات المرتبة بشكل منفرد أو مزدوج أو ثلاثي (شكل ٣ ـ ٩).

تعرف العدسات الشيئية شائعة الاستعمال بالعدسات اللالونية (Achromats) وتمتاز هذه العدسات بأن الزيغ اللوني معدل عن طريق جمع الأشعة الحمراء والزرقاء في بؤرة واحدة. ويعطي هذا لونًا باهتًا كطيف ثانوي (أخضر تفاحي شاحب) يمكن رؤيته حول حواف العينة مما يجعل عملية التباين (Contrast) أكثر وضوحًا. أما الزيغ الكروي في هذه العدسات فهو الآخر معدل على طول موجة ضوئية واحدة عادة تختار في مجال بين الأخضر والأصفر للطيف، ولهذا تكون نتائج هذه العدسات أفضل عند استخدام مرشح ضوئي أخضر يسمح بمرور ضوء طول موجته في حدود ٥٥٠ نانومتر Nanometer (nm.).



شكل ٣ ـ ٩: قطاع طولي في عدسة زيتية حديثة.

(عن برادبيوري، ١٩٨٤)

لكن تمتاز العدسات الشيئية نصف المفرطة اللالونية (نصف الأبوكروماتية Semiapochromatic) والعدسات الشيئية الفلوراتية (Fluorite objectives) بأنها مطورة بشكل أدق. ففي كلا الحالتين قد تم تعديل الزيغ الكروي واللوني لكل منها كما وأنها تملك فتحات عددية أعلى من تلك المعروفة في الشيئيات اللالونية بينما نجد أن العدسات الفلورايتية تملك مسافة عمل أقل من تلك المتعارف عليها في العدسات اللالونية. وعلى أي حال تعتبر العدسات الشيئية مفرطة اللالونية (الأبوكروماتية Apochromal) أعلى ما وصلت إليه العدسات الشيئية من مستوى في التصحيح البصري. فالعدسات الأبوكروماتية تمتاز بتصحيح لوني كامل ومعدل للزيغ الكروي

عند طول موجتين ضوئيتين، ويرجع هذا بالطبع إلى التقدم في مستوى التصنيع الزجاجي وإلى الاستفادة من الحاسب الآلي في صنع مثل هذه العدسات (جدول ٣ ـ ١). ونظرًا للتقدم الرفيع في مستوى صنع العدسات، أصبح من السهل الحصول على عدسات ذات تصحيحات دقيقة جداً تُعطي ما يعرف بالحقل المسطح أو المستوى، لذا تعرض هذه العدسات بالعدسات مستوية الحقل (Flat-field lenses) أو بالعدسات المفرطة اللالونية المستوية (Planapochromats) والعدسات اللونية المستوية (Planochromats). على العموم هناك العديد من العدسات الشيئية بعضها يحتوي على ما يعرف بصفائح الطور (phase-plates) مما يجعلها مناسبة لدراسة العينات الحية غير المصبوغة كما هي الحال مع المجهر ذي الطيف المتباين. كما أن البعض الآخر مصمم لفحص أسطح المعادن والتي تعمل دون الحاجة إلى وضع غطاء الشريحة على العينة المدروسة. وهناك العدسات التي تمتاز بمسافة عمل كبيرة مثل تلك المصنعة خصيصا للتشريح المجهري.

جدول ٣ ـ ١ مقارنة بين العدسات الشيئية من حيث قوة التكبير والبعد البؤري والفتحة العددية

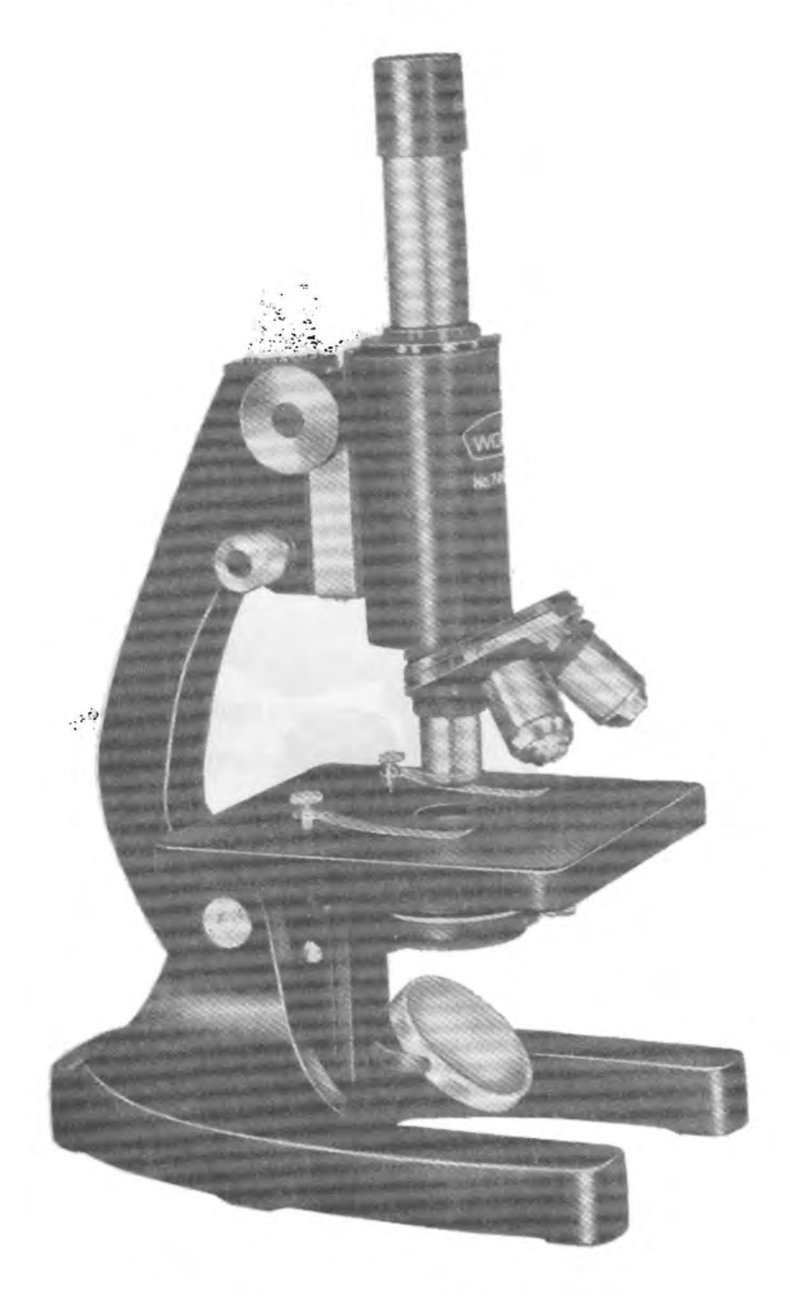
نوع العدسة الشيئية	قوة التكبير	الفتحة العددية	البعد البؤرى (مم)
١ ـ اللالونية (جافة dry) Achromat	١٠	٠,٢٢	١٦
٢ ـ اللالونية (زيت oil) Achromat	١٠٠	١,٢٥	٢
٣ ـ فلوريتية (جافة dry) Fluorite	٤٠	٠,٧٥	٤
٤ ـ فلوريتية (زيت oil) Fluorite	١٠٠	١,٣٠	٢
٥ ـ المفرطة اللالونية المستوية Planapochromatic			
ا ـ جافة	١٠	٠,٣٠	١٦
ب ـ زيت	١٠٠	١,٣	٢
٦ ـ مفرطة اللالونية زيت Apochromatic oil	٩٠	١,٤	٢

جهاز الإضاءة Illumination System

في الزمن الماضي، كانت إضاءة المجهر الضوئي تعتمد على ضوء الشمس أو لهب الشموع، وفي القرن التاسع عشر كانت قناديل الزيت هي المستعملة كمصدر للإضاءة. ولقد كان جهاز الإضاءة قديما يوضع بشكل يضمن تركيز أشعة الضوء على العينة من أعلى باستخدام عدسة النظارة العينية أو دورق زجاجي مملوء بالماء المالح. لكن عندما بدأ الاهتمام بالتركيز على دراسة العينة بالأشعة الضوئية النافذة (Transmitted light) كانت مصادر الإضاءة المستخدمة هي نفس المصادر سابقة الذكر. لكن الأشعة في هذه الحالة كانت تعكس بوساطة مرآة توضع تحت العينة المراد فحصها (شكل ٣-١٠).

أما اليوم فلقد استبدلت قناديل الزيت بالمصابيح الكهربائية (Electric bulbs) ومثل هذه الإضاءة الخارجية تعطى كمية كافية من الضوء عند الحاجة. وفي الوقت الحاضر معظم المجاهر تحتوي على مصدر إضاءة داخلي مزود بعدسات جامعة يوجد عادة في قاعدة المجهر. مثل هذه المجاهر تعرف باسم المجاهر مبنية الإضاءة (Built in illumination) ، شكل ٣ - ١١. هذه الإضاءة مبنية داخل المجهر تضمن عدم تشتت أشعة الضوء وهذا يسهل العمل المجهري. وكما هي العادة فإن أشعة الضوء توجه إلى المحور البصري للمجهر بوساطة منشور خاص ولذا نجد عدم الحاجة إلى المرآة العاكسة وكما هو متبع في المجاهر الحديثة نجد أن جهاز الإضاءة مزود بالحجاب الحدقي (Iris diaphragm) يطلق عليها اسم حدقة الحقل (Field iris) وبها يتم التحكم وحصر حزمة الأشعة الضوئية الصادرة من المصباح الكهربائي، يزيد هذا من تباين الصورة عند اختزال شدة الوهج.

إن المصابيح الكهربائية المستعملة في المجاهر تمتاز بجهد كهربائي منخفض (Low voltage) وذات تصميم خاص فيها تكون لفات الخيط متجمعة معاً بشكل محكم ومتراصة جنبا إلى جنب لتكون مصدرا ضوئيا متماسكا. أما العدسة الجامعة (Collector lens) فوظيفتها الأساسية تكوين حزمة ضوئية كافية لإضاءة فتحة المكثف،



شكل ٣ ـ ١٠ : مجهر ضوئي مركب وحيد العينية بمرآة .



شكل ٣ ـ ١١ : مجهر مركب كهربائي الإضاءة ثنائي العينيات .

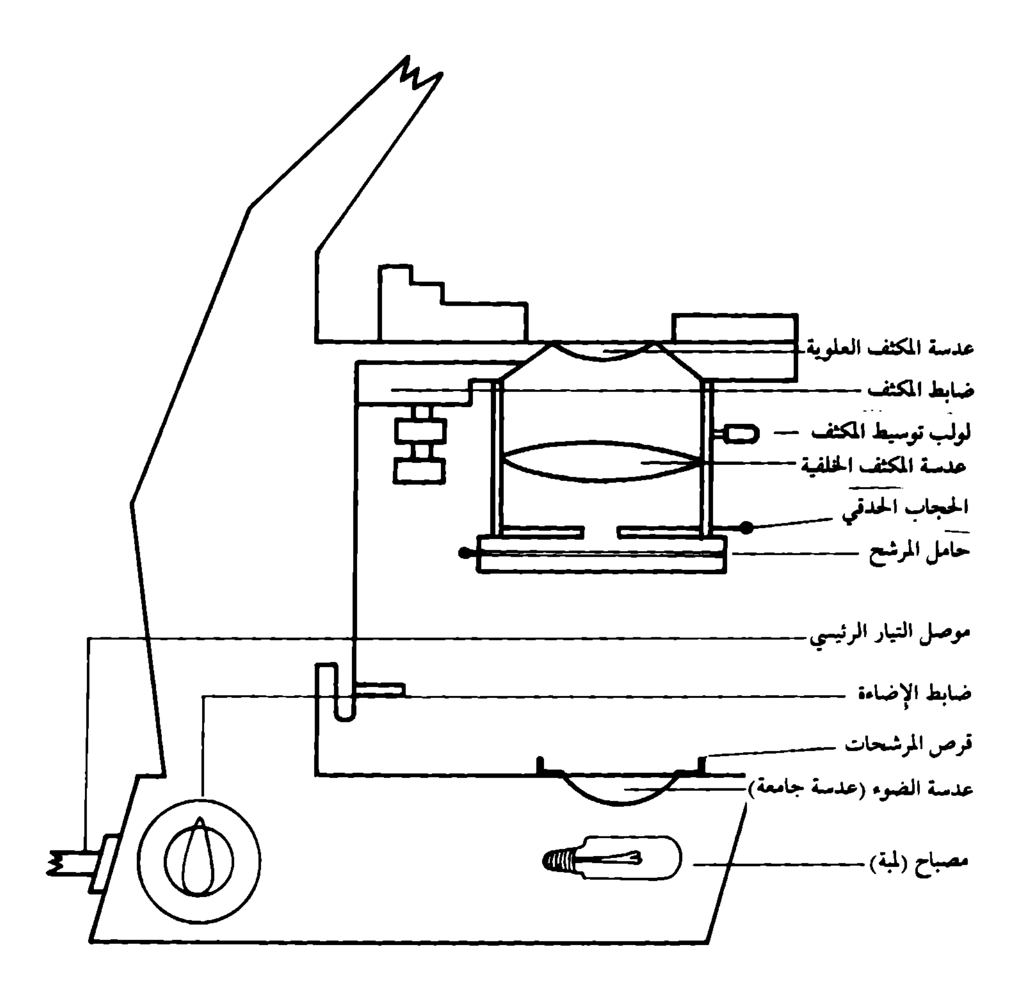
وهذا أمر ضروري لكي تكون قدرة التحليل للمجهر عالية . كما تمتاز المصابيح ذات الخيوط التنجستنية (Tungsten filaments) بأنها تعطي ضوءا حادا بالإمكان التحكم في شدته بسهولة وذلك باستخدام ما يعرف بالمقاومة المتباينة المرفقة في دائرة المحول

(Transformer circuit). أما في الوقت الحاضر فلقد أصبحت مصابيح الكوارتز الهالوجينية (Quartz halogen) هي شائعة الاستعمال وهي عبارة عن مصابيح تحتوي على غاز اليود (Iodine) أو البرومين (Bromine) لكي يمنع اسوداد غلاف المصباح الناتج من المخلفات المتصاعدة من احتراق خيط التنجستن. كما تمتاز هذه المصابيح بضوئها الوهاج وحرارتها اللونية العالية مما يجعلها مناسبة لعمليات التصوير المجهري، لكن حرارتها العالية تعني وجوب توفير التهوية الجيدة لها حتى تعمل لمدة أطول.

كما تستخدم حاليا مصابيح بها أقواس زئبق عالية الضغط (High pressure mercury arcs) وهذه تضمن الحصول على ضوء أحادي اللون وبالذات اللون الأخضر والذي يمتاز بطول موجته البالغ ٥٤٦ نانومتر. كما يمكن الحصول على ضوء طول موجته ٣٦٥ نانومتر وذلك باستخدام مرشحات ضوئية مناسبة، ومثل هذا الشعاع مفيد في عمليات الإثارة الإشعاعية في المجاهر الفلورسينية (Fluorecence microscope). أما أقواس الزينون عالية الضغط (Xenon high pressure arcs) فهي الأخرى شائعة الاستعمال أثناء التصوير المجهري (Photomicroscopy) لامتيازها بضوء شديد الوهج، يعني هذا إمكانية استخدام مثل هذه المصابيح أثناء التصوير بالأفلام الملونة العادية دون الحاجة إلى استخدام مرشحات الضوء اللونية.

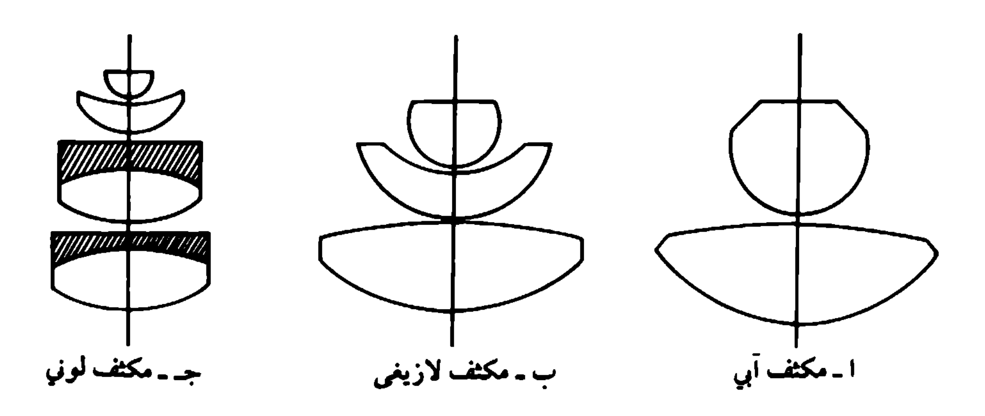
وبشكل مختصر فإن مصدر الإضاءة (Illumination source) عبارة عن مصباح (لمبة، Lamp) يوجد في قاعدة المجهر ويزود بالتيار الكهربائي من خلال موصل التيار الرئيسي (Mains lead). ونظرًا لأن شدة الإضاءة تلعب دورًا مهما في رؤيا المجهر لذا يزود بجهاز خاص للتحكم في شدة الضوء يعرف بضابط شدة الضوء (Light intensity control). الأشعة الضوئية المنبعثة من المصباح الكهربائي للمجهر تركز باتجاه المكثف بوساطة عدسة أو منشور خاصة تقع فوق المصباح مباشرة وتعرف بعدسة الضوء (Light lens). كما أن كمية الإشعاع المنبعثة من المصباح من السهل التحكم فيها بما يعرف بالحجاب الحقلي (Field diaphragm) والمثبت فوق عدسة الضوء. كما يوجد قرص صغير يحيط بعدسة الضوء يوضع به مرشحات الضوء الملونة

(Colourd light filters) المرغوبة والذي يعرف بقرص المرشحات (Disc filters) (شكل ٣ - ١٢).



ومهما كان نوع الإضاءة المستعمل فلابد من استخدام ما يعرف بالمكثف تحت المسرحي (Substage condenser). وظيفة المكثف الرئيسية هي تكثيف الأشعة الضوئية بشكل مركز على العينة المراد فحصها وضمان الحصول على مخروط ضوئي يتناسب مع الفتحة العددية للعدسة الشيئية للمجهر. تتم عملية التحكم في المخروط الضوئي حتى يتناسب مع الفتحة العددية للعدسة الشيئية المستعملة بوساطة الحجاب الحدقي للمكثف (Iris diaphragm). كما أن المكثف يمكن تجهيزه بحيث يتناسب مع طبيعة المجهر إذا كان مظلم الحقل أو متأين الطيف كأن يزود المكثف بما يعرف بحلقة المكثف (Annular) وهذه تضمن الحصول على نمط خاص من الإضاءة.

المكثفات تحت المسرحية متباينة، فهناك المكثف البسيط جدا والذي يتكون من عدسة واحدة محدبة مستوية الوجهين (Plano-convex lens) ويستعمل مع العدسات الشيئية منخفضة التكبير. ويعتبر مكثف آبي (Abbe) من أكثر المكثفات شيوعا في المجاهر العادية. هذا المكثف عبارة عن عدستين من زجاج شديد النقاوة (شكل ٣ ـ ١٣ أ) لكن ينقصه ما يعرف بالتصحيحات اللونية (Chromatic corrections). كما يعاني من مشكلة الزيغ الكروي (Spherical aberration) مما يجعل إضاءة الحقل بشكل منتظم أمرا مستحيلا، وهذا قد يؤدى إلى وهج قوي يحد من جودة تباين الصورة النهائية للعينة. كما يمكن استخدام مكثف آبي مع العدسات الشيئية الزيتية لكن النتائج قد تكون أفضل بكثير فيما لو استخدم مكثف تحت مسرحي أكثر تطورا مثل المكثف اللازيغي (Aplanatic condenser) (شكل ٣ ـ ١٣ب). يعمل المكثف اللازيغي على تصحيح وإزالة معظم الزيغ الكروي أو الانحناءات الحقلية لكنه لا يزال يعاني من مشكلة الزيغ اللوني (Chromatic aberration). وهناك المكثف اللوني (Chromatic condenser) (شكل ٣ ـ ١٣جـ)، وهذا يمتاز بقدرته على تمرير مخروط من الضوء يتناسب تماما مع الفتحة العددية حتى ولو كانت عالية كما هي الحال مع العدسات الزيتية والتي قد تصل إلى ١٠٤ . هذا النوع من المكثفات اللونية يمتاز بقدرته على تصحيح كل من الزيغ الكروي والزيغ اللوني كما يمكن استخدام الزيت بين عدسة المكثف العليا والشريحة المجهرية.



شكل ٣ ـ ١٣ : أنواع المكثفات (عن برادبيوري ١٩٨٤).

المهم أن جميع المكثفات تحت المسرح يمكن التحكم فيها بحيث يصبح مستوى العينـة المدروسة في مستوى بؤرة هذه المكثفات أو بمعنى آخر تصبح العينة في قمة المخـروط الضـوئي الخارج من المكثف. وتتم عملية التحكم هذه باستخدام ضابط المكثف (Condenser control). ومهما كانت نوعية المكثف المستعمل، فلابد من ضبط الإضاءة حتى تطابق الشروط المعروفة باسم الإضاءة الحرجة (Critical illumination) أو إضاءة كوهلير (Kohler illumination). تتم الإضاءة الحرجة بأن تكون العينة في قمة مخروط الضوء الصادر من المكثف، أي في بؤرة المكثف تماما حيث تتجمع فيها جميع أشعة الضوء الصادرة من مصباح الإضاءة أما إضاءة كوهلير والمستعملة عادة في مجاهر التصـوير فتتم بوضـع صورة خيط المصبـاح في مستوى بؤرة المكثف بوساطة مكثف المصباح الضوئي على شكل صورة مكبرة. هذه الصورة المكبرة لخيط المصباح بدورها توضع في مستوى الجسم المراد دراسته بوساطة المكثف تحت المسرحي نفسه وبحيث تظهر على هيئة صورة ثانوية منتظمة الإضاءة. ونظرا لأن صورة المصدر الضوئي تقع في بؤرة المكثف تحت المسرحي، إذا فلابد أن تكون هناك أشعة ضوئية متوازية تخرج من جميع زوايا قمة المكثف، هذه الأشعة تجمع وتكثف بوساطة العدسة الشيئية لكن تشكل صورة ضوئية في مستوى البؤرة الخلفية للعدسة الشيئية. وهذه الصورة الضوئية الأخيرة

يجب أن تكون كافية لتملأ الفتحة العددية للعدسة الشيئية، لذا يستعمل عادة مصباح ذو خيط ضوئي كبير. المهم في الأمر أنه في كلا الحالتين من الإضاءة الحرجة أو إضاءة كوهلير فإن الحجاب الحدقي للمصباح يلعب دورا مهما في عملية التحكم في مساحة حقل الرؤية المضاء مما يسهل عليه التحكم في شدة التوهج.

وباختصار مفيد، نجد أن المكثف يقع دائما أسفل المسرح مباشرة ويقوم بتجميع الأشعة الضوئية وتكثيفها في بقعة محددة على العينة المدروسة مما يسهل رؤية تفاصيلها الداخلية. يتكون المكثف عادة من أنبوب معدني يحتوي على نوعين (أو أكثر) من العدسات الضوئية، الأولى توجد في قمة المكثف وتعرف بعدسة المكثف العلوية (Condenser's top lens). والثانية توجد في أسفل المكثف وتسمى بعدسة المكثف الخلفية (Condenser's back lens) أو العدسة الأساسية (Main lens). كما يزود المكثف بالعديد من الضوابط والمعدات الثانوية التي تساعد على فعاليته في تجميع أشعة الضوء. فيوجد للمكثف ضابط خاص لرفع أو خفض مستوى المكثف ويعرف بضابط المكثف (Condenser control focus). وللمكثف ضابطان يتم بوساطتهما التحكم في توسيط المكثف مع مسار الأشعة الضوئية ويشار اليهما باسم لولبي توسيط المكثف (Condenser centering screws). كما يزود المكثف بحجاب حدقي (Iris diaphragm) من السهل التحكم في قطر فتحته الحدقية وذلك عند الرغبة في تحديد مساحة الحقل المضاء بشكل دقيق (شكل ٣ ـ ١٢).

استعمال المجهر

بعد معرفة التركيب الدقيق للمجهر المركب أصبح من الضروري معرفة كيفية استخدام هذا النوع من المجاهر وبالأصح استخدام ما يعرف بالمجهر مضيء الحقل (Bright-Field microscope). ولعله من الأنسب والأسهل أن نتطرق إلى كيفية استعمال المجهر بذكرها في الخطوات الآتية:

١ ـ توضع الشريحة، التي تحتوي على العينة المراد دراستها، فوق مسرح المجهر بشكل جيد ويتأكد تماما بأنها أخذت وضعها الصحيح لتكون العينة الى الأعلى كما يجب

أن تقع في مستوى الثقب المركزي للمسرح وإذا لم تكن كذلك وجب تحريكها وضبطها بوساطة محركات المسرح الآلي.

٢ ـ يفتح ضابط الضوء بحذر شديد وتزاد الإضاءة بالتدريج حتى تكون شدة الإضاءة متوسطة.

٣ ـ تفتح حدقة الحقل (Field-iris) للمصباح «لمبة» تماما وكذلك الحال مع الحجاب الحدقي (Iris diaphragm)، ثم تستعمل أصغر العدسات الشيئية الجافة من حيث قوة التكبير. ينظر من خلال العدسة العينية إذا كان المجهر وحيد العينية (Monocular microscope)، أو من خلال العدستين العينيتين إذا كان المجهر ثنائي العينية (Binocular microscope)، وبحذر شديد يرفع المسرح بالتدريج وباتجاه العدسة الشيئية الصغرى وذلك باستخدام الضابط الخشن (Coarse control) حتى تظهر ملامح العينة.

٤ ـ بعد ظهور ملامح العينة، يدار الضابط الدقيق (Fine control) باتجاه عقارب الساعة أو عكس عقارب الساعة وبحذر شديد حتى تتضح معالم العينة بشكل أدق.

٥ ـ تغلق حدقة الحقل للمصباح وينظر من خلال العدسة العينية فيما إذا كانت الإضاءة تبدو على شكل بقعة من الضوء الوهاج، وهل هذه البقعة تتوسط مجال حقل المجهر أم تتخذ وضعا جانبيا.

٦ ـ إذا كانت البقعة الضوئية غير شديدة الوهج فعند هذه الحالة يجب ضبط المكثف بوساطة ضابط المكثف (Condenser control) وذلك برفع المكثف إلى أعلى أو خفضه إلى أسفل حتى تصبح إضاءة البقعة الضوئية شديدة التوهج.

٧ ـ أما إذا كانت البقعة الضوئية شديدة التوهج لكنها لا تتوسط المجال الحقلي للمجهر، ففي هذه الحالة يجب وضعها في مركز الحقل وذلك باستخدام لولبي توسيط المكثف.

٨ ـ تفتح حدقة الحقل مرة ثانية، وفي هذه الحالة تعتبر إضاءة المجهر مضبوطة إذا كانت الإضاءة شديدة جدا بالامكان التحكم في شدتها أما عن طريق ضابط الضوء أو باغلاق الحجاب الحدقي للمكثف قليلا حتى لا تتعب عين الفاحص.

٩ ـ بالإمكان استخدام عدسة شيئية جافة ذات تكبير أعلى وذلك بتحريك القطعة الأنفية (Nose-piece) للمجهر، وفي هذه الحالة يجب استعمال الضابط الدقيق للمجهر حتى تتضح معالم العينة. كما يجب التنبيه والتحذير من استعمال الضابط الخشن مع العدسات الشيئة ذات قوى التكبير العالية نظرا لأن المسافة بين العدسة والعينة عادة تكون صغيرة جدا (انظر جدول ٣ ـ ١). كما أنه يفضل تكرار الخطوات (٥، ٦، ٧) مع كل عدسة شيئية لضمان جودة الإضاءة.

١٠ ـ عند استخدام العدسة الشيئية الزيتية يلزم الحذر التام لأن مسافة عمل هذه العدسة قصيرة جدا في حدود ٢ مم فقط. يخفض المسرح إلى أسفل باستخدام الضابط الخشن للمجهر ثم توضع قطرة صغيرة من الزيت في وسط الشريحة. يرفع المسرح مرة ثانية مع مراقبة العدسة الزيتية، وعدم السماح لها إطلاقا بملامسة الشريحة، لكن بمجرد ملامستها للزيت ينظر خلال العدسة العينية ويدار الضابط الدقيق مع اتجاه أو عكس اتجاه عقارب الساعة قليلا حتى تتضح معالم العينة. بعد الانتهاء من الفحص بالعدسة الزيتية يجب تنظيفها تماما ومباشرة من الزيت وذلك باستخدام ورق العدسات (Lenses paper).

لكي يبقى المجهر صالحاً للاستعمال ولفترات طويلة يجب أن يعطي عناية خاصة وبالذات من حيث النظافة حيث تعتبر الأوساخ والأتربة هي العدو اللدود للمجهر، ولكي يبقى المجهر وجهازه البصري نظيفا لابد من تتبع الخطوات التالية:

١ ـ يجب عدم لمس العدسات إطلاقا بالأصابع. عندما يظهر عليها آثار من الغبار أو الأوساخ بل يجب تنظيفها بأوراق العدسات. .

٢ ـ يجب التأكد من تنظيف العدسة الزيتية من آثار الزيت بعد الانتهاء من الفحص مباشرة وذلك بمسحها جيدا بورق العدسات. كذلك الحال مع العدسات الشيئية الجافة يجب ألا يلامسها الزيت إطلاقا، وإذا حدث فلابد من تنظيفها كما هي الحال عليه في العدسات الزيتية. إذا حدث وأن جف الزيت على العدسة وأصبح

إزالته صعبة فبالإمكان مسح العدسة بورقة عدسات مبللة بقليل من الزيلول.

٣ ـ يجب أن يكون مسرح المجهر دائما بحالة نظيفة، ويفضل دائما أن ينظف بقطعة من القماش اللين، وإذا حدث وأن تلوث بقليل من الزيت في هذه الحالة يمسح بقطعة من القماش المبللة بالزيلول ثم بعدها يجفف تماما.

٤ ـ في حالة عدم استخدام المجهر يجب تغطيته ووضعه في الصندوق الخاص به حفظا له من الأتربة والأبخرة أو الصدمات غير المقصودة.

وأثناء استخدام المجهر يجب مراعاة الآتي:

١ ـ لا يُسمح إطلاقا للعدسات الشيئية أن تلامس الشريحة.

٢ ـ لا يسمح بحمل المجهر إلا عن طريق الذراع باليد اليمنى ووضع اليد اليسرى تحت القاعدة.

٣ ـ لا يسمح بترك العدسات الشيئية عالية التكبير عمودية على ثقب المسرح بعد الانتهاء من الفحص، بل يفضل ترك العدسة الشيئية الصغرى نظرا لقصرها.

٤ ـ لا يسمح باستعمال الضابط الخشن إطلاقا مع العدسات الشيئية عالية التكبير وبالذات الزيتية إلا إذا كان الشخص يعي ماذا يعمل ويدرك الخطر المتوقع.

٥ ـ لا يسمح العمل بخشونة مع المجهر فجميع ضوابطه وحركاته يجب أن تعمل بكل يسر وإذا حدث عكس ذلك فيترك الأمر إلى الفني المختص بالمجهر.

٦ ـ لا يسمح بفك العدسات الأمامية (Front lenses) للعدسات الشيئية بأي حال من الأحوال.

المجهر مظلم الحقل

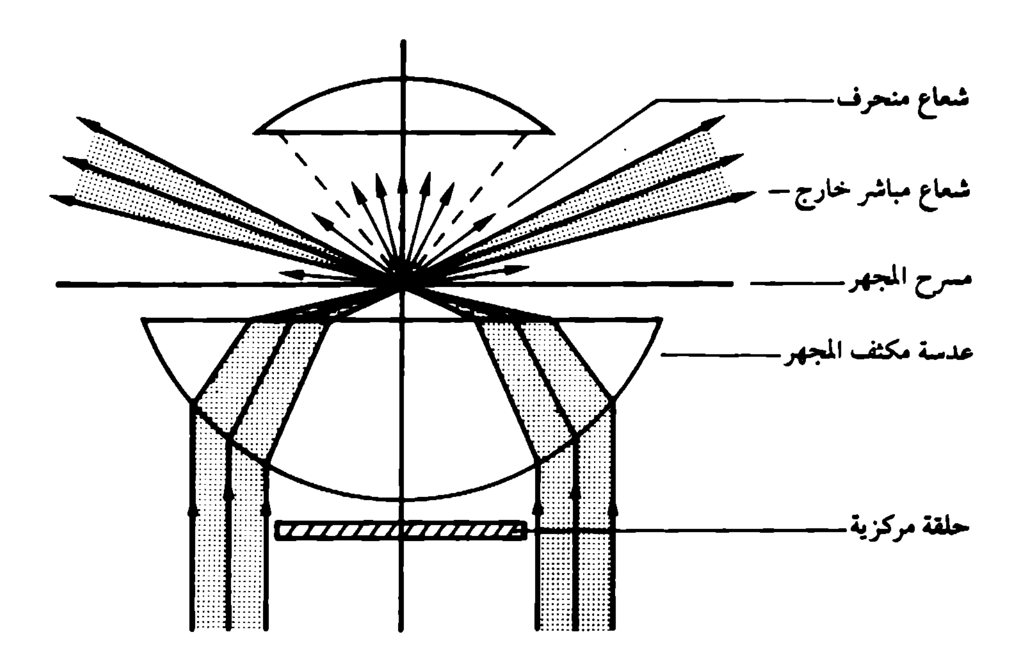
إن المجهر مظلم الحقل (Dark-field microscope) لديه القدرة على إعطاء صورا على مستوى عال من التباين سواء كانت لعينات حية أو ميتة غير مصبوغة، لكن بشرط أن يكون هناك تناقص ملحوظ في معامل الانكسار بينها وبين بيئة التحميل المحيطة بها. ولقد نظم الجهاز البصري لهذه المجاهر لكي يعطي صورًا براقة ضد ظاهرة التباين، أو بمعنى آخر تبدو الصورة براقة في وسط حقل مظلم تماما؛ ومن هنا جاءت

التسمية، بينما معظم المجاهر تعطي صورا معتمة في وسط حقل مضيء. إن ظاهرة عكس التبـاين في المجهر مظلم الحقل تزيد بلا شك قدرة الفاحص في تتبع ورؤية التفاصيل الدقيقة على الرغم من أن قدرة التمييز في هذه المجاهر لا تزيد عن المجاهر الضوئية العادية.

وكما هو معروف، إن تشكل الصورة المجهرية يعزى إلى دخول كل من الضوء المباشر والضوء المنحرف والصادر من العينة الى العدسة الشيئية، حيث تعطي تفاصيل واضحـة المعالم لهذه العينة. لكن إذا استبعدنا الضوء المباشر بأكمله من المساهمة في تشكيل الصـورة المجهرية بمنعه من الدخول إلى العدسة الشيئية، فإننا نستطيع أن نحصل على صورة كاملة التفاصيل، لكن بتباين معاكس. ولو منعنا الضوء المنحرف من الوصول إلى العدسة الشيئية، فإننا في هذه الحالة لا نحصل على الصورة المجهرية إطلاقا. ولكي تتم عملية منع الضوء المباشر من الوصول الى العدسة الشيئية، توضع حلقة مركزية (Central circular) في المستوى البؤرى للمكثف، ووظيفة هذه الحلقة تكوين مخروطا مجوفا للأشعة الضوئية وبحيث تكون فيه الأشعة الداخلية لهذا المخروط تقع خارج نطاق زاوية القبول للعدسة الشيئية (شكل ٣ ـ ١٤).

الجـدير بالـذكـر، أن زاوية القبول تختلف من عدسة إلى أخرى ولهذا فإنه من الضروري استخـدام حلقـات مركـزية مختلفـة تتنـاسب مع زوايا قبـول العدسات المستعملة وعندما تستخدم الحلقة المركزية المناسبة فإن الحقل المظلم سوف يكون رائعا. إذا ليس بالغريب أن مثل هذه الحلقات المركزية لا تزود بها المجاهر الضوئية العادية.

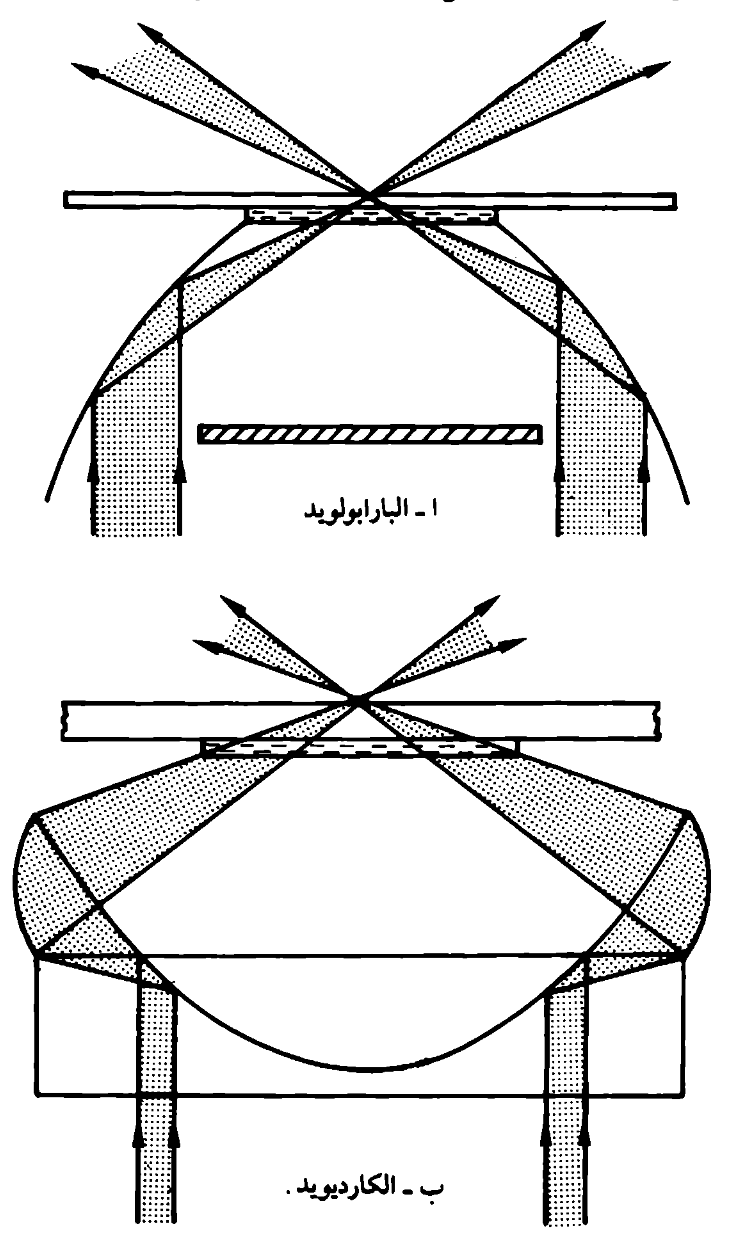
إن استخدام المجهر مظلم الحقل يناسب دراسة الكائنات المائية مثل الأوليات (Protozoa) والجوفمعويات الصغيرة. كما يلعب المجهر مظلم الحقل دورا بارزا عند الرغبة في دراسة طبيعة حركة الأهداب وكيفية عملها في الحيوانات الهدبية. كما يمكن استخدام المجهر مظلم الحقل عند قوى تكبير عالية بوساطة العدسات الزيتية، لكن يجب الأخذ في الاعتبار أن تكون الفتحة العددية للعدسات الزيتية أصغر من الفتحة



العددية للمكثف لكي نضمن أن جميع الضوء المباشر لا يصل إلى العدسة الزيتية. لهذا فغالبا ما تكون العدسات الزيتية في المجاهر مظلمة الحقل تحتوي على حجاب حدقي من السهل التحكم فيه حتى نضمن دائما أن تكون الفتحة العددية للعدسة الزيتية أصغر من الفتحة العددية للمكثف.

وإضافة إلى ما سبق ذكره، فإن المكثفات العادية لا تستخدم في المجاهر مظلمة الحقل وخصوصا عند استعمال العدسات الشيئية عالية التكبير نظرا للحاجة إلى الحصول على مخروط ضوئي عالي الانفراج. لهذا تستعمل مكثفات خاصة يوضع الزيت بينها وبين الشريحة المجهرية لكي نضمن أن الأشعة الضوئية المائلة لم تنعكس من اسفل الشريحة. ويوجد نوعان من المكثفات الخاصة بالمجهر مظلم الحقل، يعرف الأول باسم البارابولويد (Paraboloid) ، ويمتاز بسطح عاكس واحد مزود بمرآة عاكسة مقعرة وهذا

غير شائع الاستعمال في الوقت الحاضر. أما النوع الثاني وهو الأكثر شيوعا، ويعرف باسم الكارديويد (Cardioid) (شكل ٣ ـ ١٥) وهو عبارة عن مكثف سطوحه عبارة عن



ا ـ البارابولويد

ب ـ الكارديويد.

مرايا عاكسة مقعرة ومرايا عاكسة محدبة . هذا النوع الأخير لديه القدرة على إنتاج أشعة ضوئية شديدة الانحراف، ولذا نجد أنه يستعمل مع العدسات الزيتية شريطة أن تكون فتحاتها العددية منخفضة أو بها ما يعرف بالحجاب الحدقي .

وكما هو معروف، إن العينة المدروسة يجب أن تكون في بؤرة المخروط الضوئي . ويعني هذا ضرورة التبئير (Focusing) الصحيح للمكثف ووضعه مركزيا مع المحور البصري للمجهر. كما يجب الإدراك بأن سمك الشريحة المجهرية أمر جوهري، فالشريحة السميكة تحول دون تبئير المكثف بالشكل الدقيق .

وعلى الرغم من أن المجهر مظلم الحقل قليل الاستعمال مع العدسات الزيتية، إلا أنه يلعب دورا مهما في بعض الدراسات، مثل دراسة الدم أو الدراسات البكتيرية، ولهذا يعتبر المجهر مظلم الحقل عالي التكبير من أحسن الأجهزة لدراسة الدم الطازج . لأن تلك العينات لا تحتاج إلى صبغ .

مجهر الطور المتباين

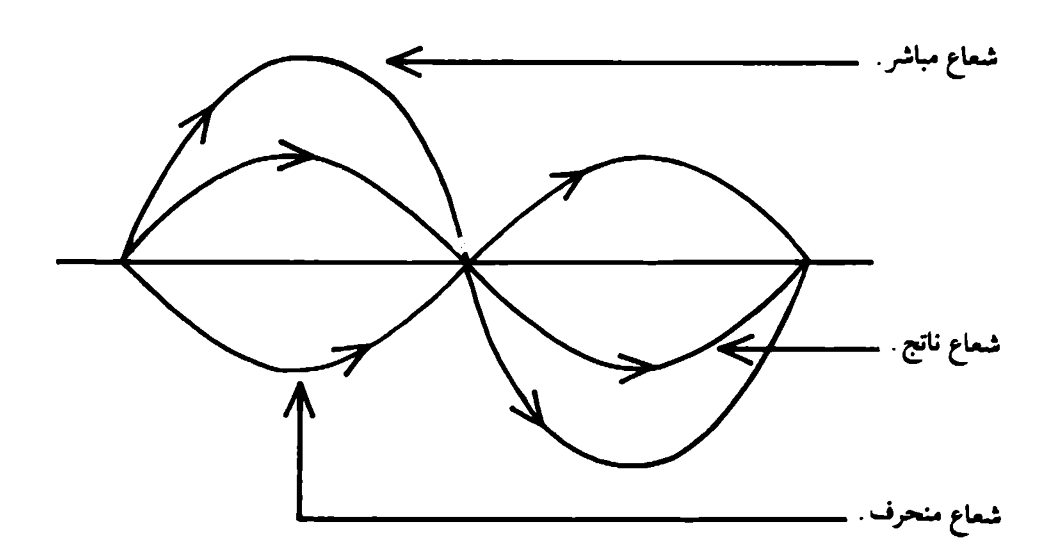
إن العينة بلاشك تؤثر على مسار الضوء المار بها وهذا التأثير قد يكون في مجال السعة الضوئية أو التغيير في طور موجات الضوء (Phase of the light waves). تستخدم العينات المصبوغة في المجاهر الضوئية العادية نظرا لأن الأصباغ تقوم بامتصاص بعض الأشعة الضوئية مما ينتج عن ذلك تغيير في السعة الضوئية أو شدة الإضاءة (Intensity) ، معروف أن شدة الإضاءة تتناسب مع مربع السعة الضوئية . إن التغير في طور الضوء (σ) يعتمد على مدى التباين بين معامل انكسار العينة وبيئة التحميل وسمك العينة ذاتها، ويمكن حساب هذا التغير من المعادلة الآتية :

$$\sigma = (n_o - n_m)\, t$$

حيث إن (n_o) تمثل معامل انسكار العينة و (n_m) تمثل معامل انكسار المادة المحيطة بالعينة، و (t) تمثل سمك العينة (Wilson & Morrison, 1977).

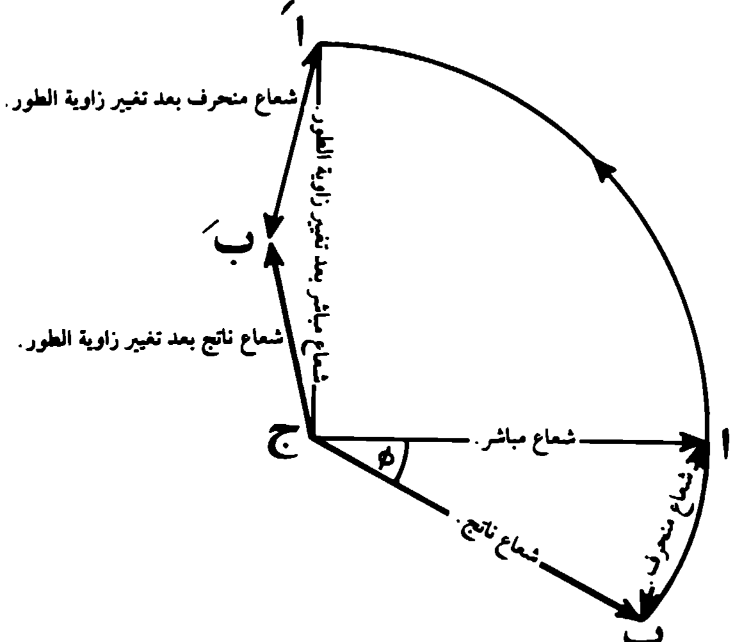
ولا تستطيع عين الإنسان أن تحس بالتغير الذي يحدث لطور موجات الضوء، ولهذا فالعينات التي تحدث مثل هذا التغير عند استخدام المجاهر الضوئية تحتاج إلى استعمال عدسات إضافية لكي تغير في السعة الضوئية. وهذا ما يقوم به مجهر الطيف المتباين.

ويرجع الفضل الأول في اكتشاف هذا النوع من المجاهر إلى العالم زرنيك (Zernike). وكما هو معروف، إن الصورة التي يكونها المجهر للعينة المدروسة تتشكل نتيجة تداخل الضوء المباشر مع الضوء المنحرف بسبب تلك العينة. في العينات المصبوغة يكون الاختلاف في الطور بين الشعاع المباشر والشعاع المنحرف وبزاوية مقدارها ١٨٠°، لهذا ينتج اختزال للسعة الضوئية، والتي بدورها تؤدى إلى حدوث التباين الضروري لرؤية العينة (شكل ٣ ـ ١٦).



شكل ٣ ـ ١٦: العلاقة بين الشعاع المباشر والمنحرف والناتج في المجهر الضوئي
(عن كارب ١٩٧٦، بتصرف)

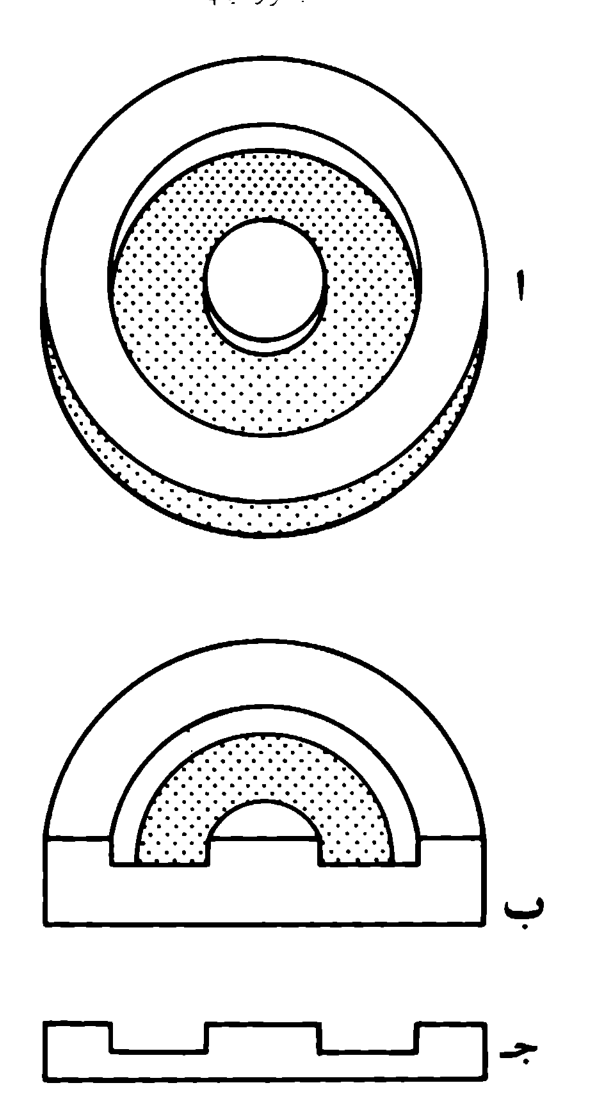
لكن لو تصورنا أن العينة شفافة جدا، عندئذ لن ينتج لدينا تغير في السعة الضوئية ولكن حتما سوف يكون هناك تغير في الطور (σ). ولو حاولنا توضيح ذلك بالرسم التخطيطي لوجدنا أن الضوء المباشر والشعاع الناتج متساويان لكن ينعزلان عن بعضهما البعض بزاوية تعادل مقدار التغير في الطور (شكل ٣ ـ ١٧)، أي أن المسافة بين الضوء المباشر والشعاع الناتج تمثل لنا الشعاع المنحرف، لو زدنا زاوية الطور (σ) وذلك بتحريك الضوء المباشر عكس عقارب الساعة إلى الوضع (أجـ) مثلا لوجدنا أن الشعاع المنحرف سوف يكون ثابتا، لكن سوف يقصر الشعاع الناتج (ب جـ) مما يؤدي إلى نقص في سعة الموجة الضوئية. لذا ينتج لدينا التباين الكافي للصورة المجهرية الشفافة. وبالإمكان عكس مظهر الصورة المجهرية بحيث تصبح أكثر بريقا من الحقل المجهري لو أعقنا الضوء المباشر مع المحافظة على الشعاع المنحرف وهذا ما يعرف بطور التباين السالب (Negative phase contrast). على العموم فإن طور التباين الموجب (Positive phase contrast) هو الأكثر شيوعا وفيه تبدو الصورة المجهرية أقل بريقا من الحقل المجهري.



شكل ٣ ـ ١٧ : العلاقة بين زاوية الطور والتباين في مجهر الطيف.

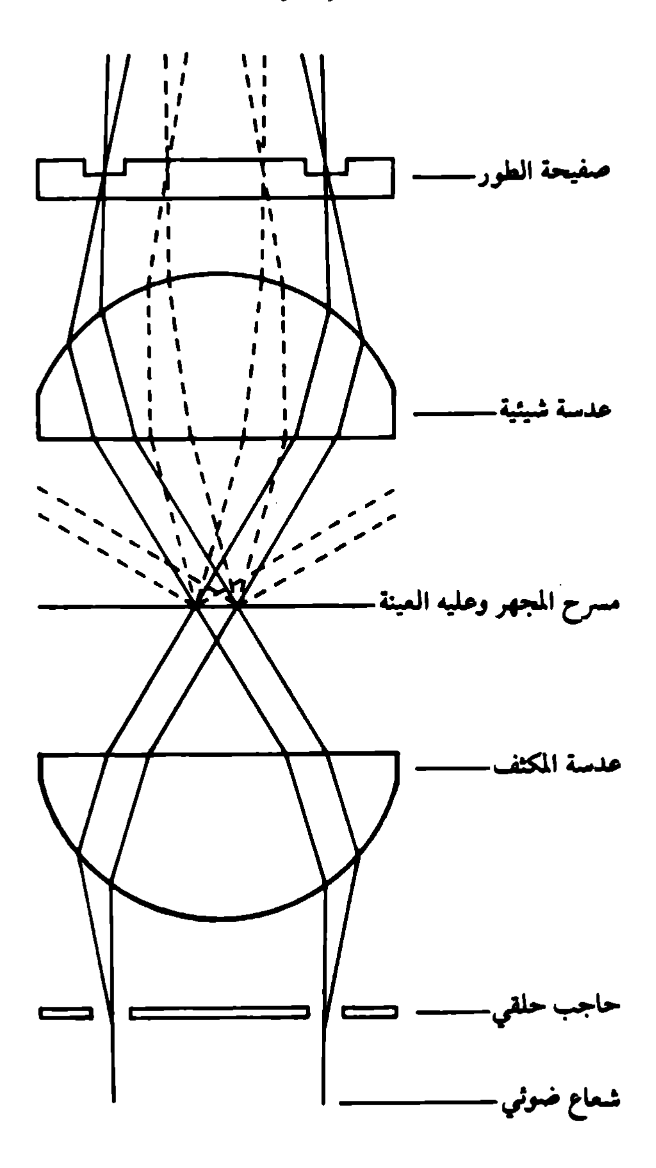
عملية التحكم في طبيعة الإضاءة تتم بتعديلات بصرية تجري في مجهر الطور المتباين وذلك بادخال ما يعرف بصفيحة الطور (Phase plate) والتي توضع خلف المستوى البؤرى للعدسة الشيئية. صفيحة الطور عبارة عن قرص من الزجاج به تجويف (Groove) دائري (شكل ٣ ـ ١٨). كما يتم الحصول على الضوء من خلال مكثف تحت مسرحي مزود بحجاب حلقي (Annular diaphragm) يقع أمام مستواه البؤري. هذا الحجاب الحلقي يجب أن يكون في مستوى يتوافق تماما مع مستوى صفيحة الطور، ويعني هذا أن حلقة الحجاب سوف تتحكم في مسار الضوء المباشر بحيث يمر تماما في التجويف الدائري الموجود على صفيحة الطور (شكل ٣ ـ ١٩). كما أن عمق التجويف الدائري لصفيحة الطور محسوب بشكل دقيق لكي يجعل زاوية الطور (σ) أكثر من ٩٠°. عندما يمر الشعاع المنحرف (نتيجة لمرور الضوء خلال العينة) من خلال سطح صفيحة الطور وبالذات السطح السميك منها، والضوء المباشر من خلال الجزء الرفيع من الصفيحة، وحيث إن العينة تؤثر على الضوء المباشر بمقدار ربع الموجة الضوئية لذا فإن الجزء السميك من صفيحة الطور سوف يؤثر على الشعاع المنحرف بمقدار أكثر في حدود نصف الموجة الضوئية. لهذا ينتج عن ذلك تباين في سعة طول الموجة وبشكل كافي لتوضيح صورة مجهرية ذات تفاصيل داخلية متباينة.

لكن يجب معرفة أن كل عدسة شيئية لها صفيحة طور خاصة بها حيث يختلف التجويف الدائري لصفيحة الطور تباينا لنوع العدسة. وينطبق هذا كذلك على حلقة الحجاب في المكثف تحت المسرحي، والتي يجب هي الأخرى أن تتناسب مع نوع العدسة المستعملة. ترتب الحلقات (Annuli) متباينة الحجم بشكل منتظم على عجلة متحركة (Rotating wheel) تُسهل عملية اختيار الحلقة المناسبة. تتم عملية تطبيق صورة الحلقة المناسبة مع تجويف صفيحة الطور في مجهر الطور المتباين القديم بإزالة العدسة العينية والنظر في أنبوب المجهر والتأكد من عملية التطابق. أما مجهر الطور المتباين الحديث، فعادة ما يزود بعدسة خاصة توضع في المسار البصري لتحول العدسة العينية إلى ما يشبه المنظار (Telescope) ليتأكد الفاحص من أن حلقة المكثف منطبقة تماما مع تجويف صفيحة الطور. مثل هذه العدسة عادة تعرف باسم المبصار (Optiphor)، وتوجد في القطعة الأنفية للمجهر ويرمز لها عادة (PH).



شكل ٣ ـ ١٨ : الشكل العام لصفيحة الطور.

(أ) شكل مجسم عام، (ب) مقطع نصفي في الشكل العام المجسم، (جـ) مقطع رأسي في الشكل العام المجسم.

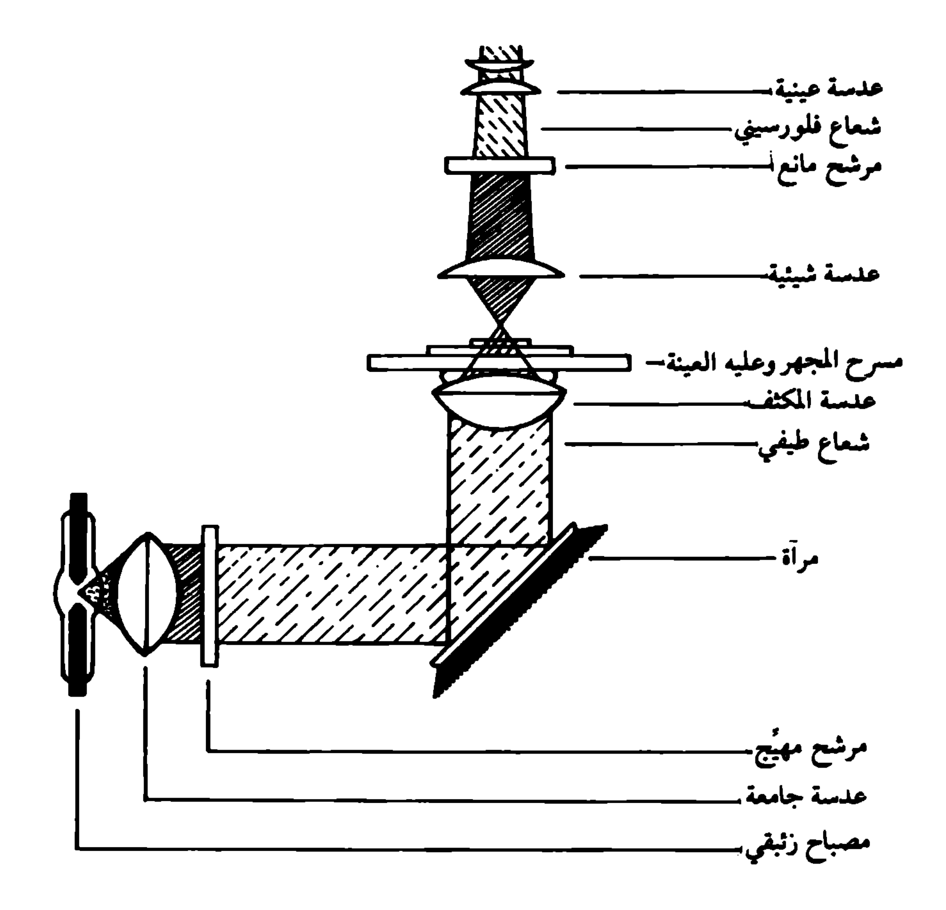


شكل ٣ ـ ١٩ : الجهاز البصري في مجهر الطور المتباين (عن سبنسر ١٩٨٢ ، بتصرف).

المجهر الفلورسيني

لقد عرف منذ زمن بعيد أن بعض المواد لها خاصية امتصاص الموجات الضوئية القصيرة مثل ألوان الطيف الأزرق والبنفسجي أو فوق البنفسجي مما يتسبب في تهيج تلك المواد وإطلاق طاقة ضوئية ذات موجة طويلة. إذا كان إطلاق مثل هذه الموجات الضوئية طويلة الموجة يستمر خلال عملية تهيج المادة فقط، فإن هذه الظاهرة تعرف بإسم الإضاءة الفلورسينية (Fluorescence) ، أما إذا استمرت الموجات الطويلة بعد توقف عملية التهيج ولو لفترة زمنية قصيرة فمثل هذه الظاهرة من الإضاءة تعرف باسم الإضاءة الفسفورية (Phosphorescence).

والمجهر الفلورسيني عبارة عن مجهر عادي لكن الإضاءة فيه تتم إما بوساطة الضوء النافذ (Transmitted light). أو بوساطة الضوء الساقط (Incident light) كما في المجاهر الحديثة. يستعمل الحقل المظلم عند الفحص بالمجهر الفلورسيني وهذا يضمن تركيز إشعاع موجات الضوء القصيرة على العينة، ولكي يتكون حقلا معتما يحيط بالصورة الفلورسينية (Fluorescent image) ذات بريق واضح أكثر مما لو أحيطت بحقل مجهري مضيء. يتركب المجهر الفلورسيني النفاذ (Transmitted fluorescence microscope) من تنظيم بصري بسيط (شكل ٣ ـ ٢٠)، كما يزود بمصدر إضاءة مسؤول عن إنتاج ضوء مهيج من قبل مصباح (لمبة) يطلق أشعة الطيف المعروفة، وغالبا يحتوي هذا المصباح على قوس زئبقي (Mercury arcs) شديد الإضاءة. يحدد الشعاع ذو الموجة القصيرة المطلوب بوساطة إمرار الأشعة على مرشح (Filter) خاص يعرف بالمرشح المولد «المهيج» (Exciter filter) والذي يسمح لشعاع واحد فقط من أشعة الطيف السبعة. هذا الشعاع قصير الموجة يعكس باتجاه مكثف المجهر بوساطة المرآة العاكسة، والذي بدوره يركز الشعاع على العينة المصبوغة. عندما يمر الشعاع قصير الموجة على العينة المصبوغة، والتي لها القدرة على امتصاص مثل هذا الشعاع تتهيج وتصدر نوعا آخر من الإشعاع طويل الموجة الذي يمر خلال العدسة الشيئية، فالعدسة العينية للمجهر مما يؤدي إلى رؤية صورة العينة البراقة. ونظرا لأن كمية من الشعاع قصير الموجة قد تمر من خلال العينة الى عدسات المجهر، وكما هو معروف إن مثل هذا الشعاع لا يرى بالعين



شكل ٣ ـ ٢٠ : الجهاز البصري في المجهر الفلورسيني ذي الشعاع النافذ.
(عن كولنج ١٩٧٤ بتصرف)

ولكنه يؤثر عليها. لذلك يتوجب وضع مرشح مانع (Barier filter) بين العدسة الشيئية والعدسة العينية للمجهر لكي يمنع مرور الشعاع قصير الموجة لكنه في نفس الوقت يسمح للشعاع طويل الموجة بالمرور وهذا بالطبع يضمن سلامة عين الفاحص.

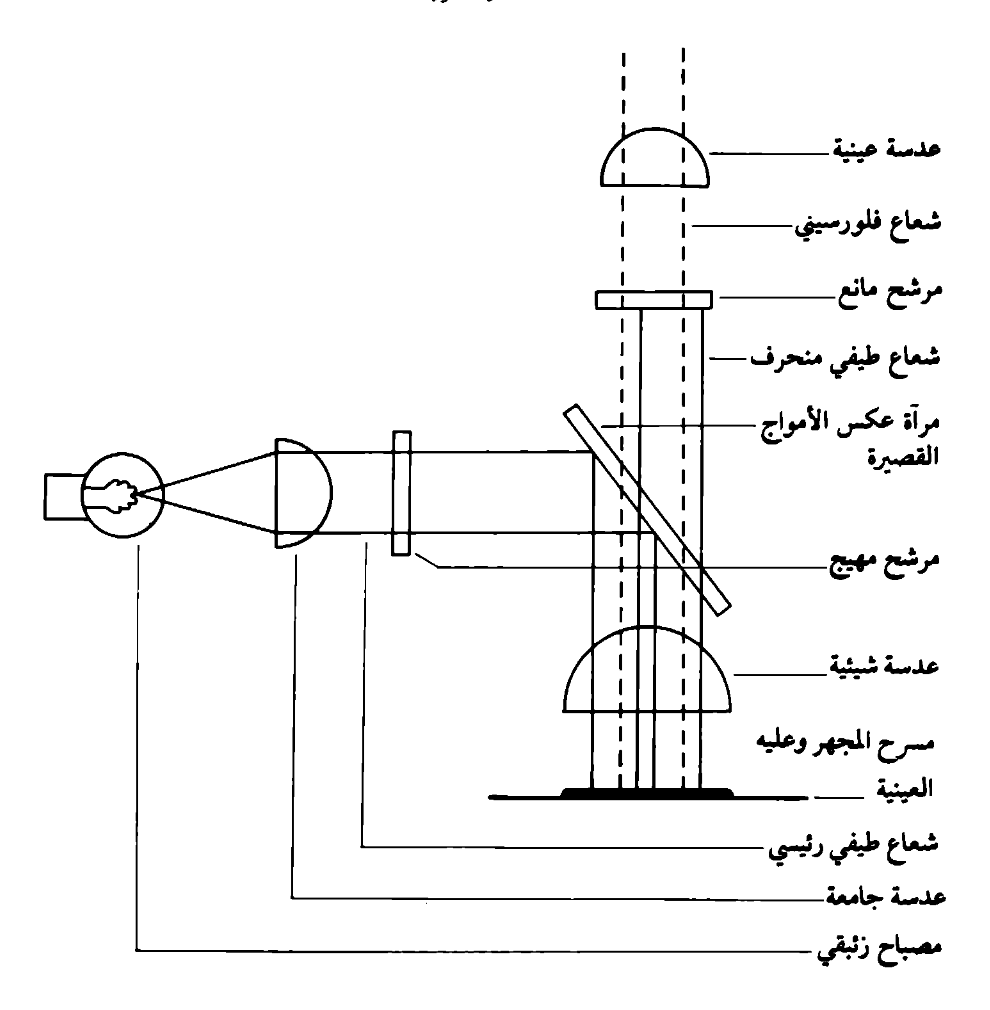
حديثا بدأ التركيز على استعمال نوع جديد من المجاهر الفلورسينية تعتمد في إضاءته على الضوء الساقط (Incident light) بدلا من الضوء النافذ. يسمح هذا النوع

من المجاهر للضوء قصير الموجه المهيج بالسقوط على العينة من أعلى ولذا تعمل العدسة الشيئية محل المكثف. الشعاع المهيج لا يسقط على جميع معالم العينة بل يقتصر على إضاءة الجزء المفحوص بالعدسة الشيئية كما أن التهيج لا يحصل إلا للأجزاء السطحية، وهذا يضمن زيادة تألق الصورة نظرًا لعدم فقدان كمية الفلورة نتيجة لامتصاص العينة لها بشكل عام. يستعمل الضوء الأزرق (Blue light) أو الأشعة فوق البنفسجية (Ultra-violet light) كمصدر للإضاءة، ولذا يكثف بوساطة عدسة مجمعة قبل نفاذه من خلال المرشح المولد (المهيج) وبعدها يعكس الى الأسفل في مركز المحور البصري للمجهر بوساطة مرآة خاصة (لها القدرة على عكس الموجات القصيرة فقط)، ليمر من خلال العدسة الشيئية والتي بدورها تكثف حزمة الإشعاع على مسطح العينة. عندما تمتص العينة هذه الأشعة قصيرة الموجة والتي تهيج بعض المواد مثل الأصباغ الفلورسينية، تنطلق موجات ضوئية طويلة الموجة تمر عبر العدسة الشيئية وتنفذ خلال المرآة العاكسة الى العدسة العينية للمجهر ومثل هذه الأشعة طويلة الموجة هي المسؤولة عن تكوين الصورة للعينة المدروسة. كما يفضل وضع مرشح مانع بين المرآة العاكسة والعينة لكي يحجب جميع الأشعة قصيرة الموجة من الوصول مباشرة إلى عين الفاحص (شكل ٣ ـ ٢١).

أخيرا يلعب المجهر الفلورسيني دورا مهما في دراسات وتصنيف الكروموسومات الخلوية وتفسير ما يحدث من تغيرات غير طبيعية في كروموسومات الخلية، كما يساهم بدور بارز في دراسة الأجسام المضادة (Antibodies) والخلايا السرطانية (Malignant cells).

المجهر المقلوب

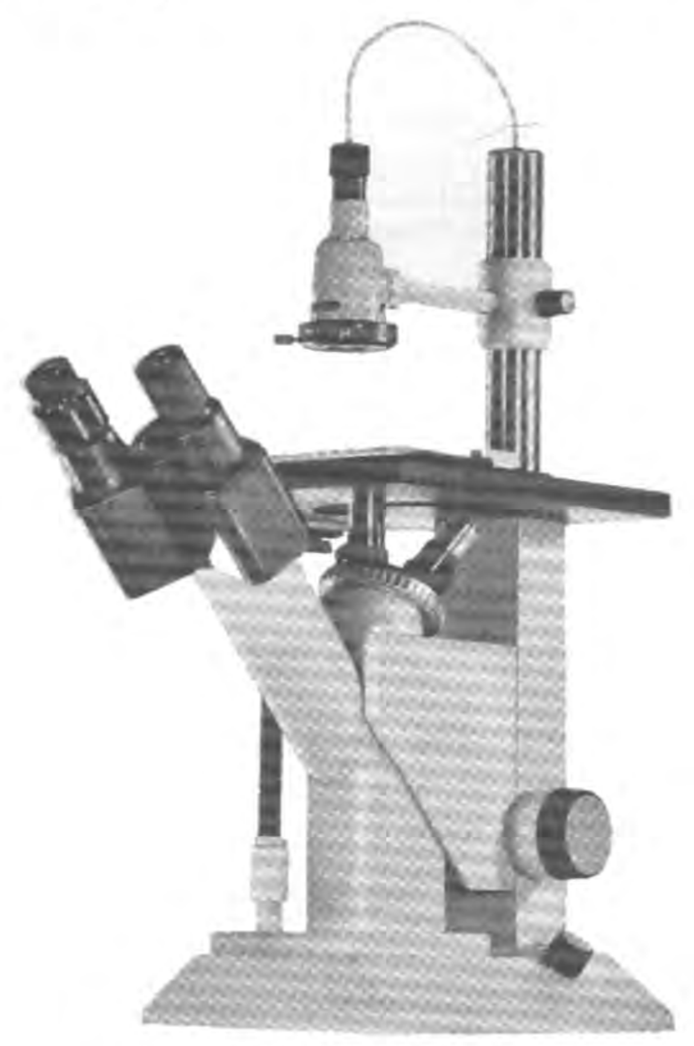
المجهر المقلوب(Inverted microscope) يعتبر مجهرا ضوئيا اعتياديا لكنه مصمم بشكل خاص ليؤدى غرضا خاصا. نجد أن هذا النوع من المجاهر يناسب دراسة الخلايا والأنسجة المزروعة (Cell and tissue cultures) وهي ما زالت في أطباق (Dishes) ودوارق (Flasks) الزراعة. فلقد قدم هذا المجهر خدمة جليلة إلى المهتمين بعلوم الحياة



شكل ٣ ـ ٢١ : الجهاز البصري في المجهر الفلورسيني ذى الشعاع الساقط.

إذ مكنهم من مشاهدة ومتابعة ما يحدث من تطورات وتغييرات للخلية وهي مازالت حية بل وهي ما زالت تباشر نشاطها الحيوي كالانقسام أو التغذية أو النمو. نظرا لأن مسافة عمل العدسات الشيئية (البعد البؤري) تكون عادة قصيرة جدا، وبالذات العدسات الشيئية عالية التكبير (جدول ٣ ـ ١). وبمعنى آخر، المسافة بين العدسة الشيئية والعينة (أو المسرح الذي توضع عليه العينة) دائما تكون صغيرة في حدود ٢ ـ ٤ مم

فقط. هذا يعني استحالة فحص الخلايا أو الأنسجة وهي ما زالت في محاليلها الغذائية، بل يجب تثبيتها وعمل ما يعرف بالشريحة المجهرية (Microscopic slides) والتي عادة لا يزيد سمكها عن ٢ مم. ولقد انتهى الإشكال بعد اكتشاف المجهر المقلوب والذي يعتمد أساسا على جعل الضوء اللازم لإضاءة العينة يسقط عليها من الأعلى، أما العدسات الشيئية اللازمة للتكبير والتمييز فتكون أسفل مسرح المجهر (شكل ٣ - ٢٢)



شكل ٣ - ٢٢ : مجهر ضوئي مقلوب.

عادة تنمو الخلايا والأنسجة المزروعة على السطوح السفلية للدوارق والأطباق، فعند وضعها فوق مسرح المجهر سوف تكون قريبة جدا من العدسات الشيئية «وهذا أمر ضروري لوضوح الرؤيا» لأن سمك جدار الطبق أو الدورق لا يزيد عن ٢ مم. أما ارتفاع الطبق أو الدورق، الذي قد يصل إلى ١٠ سم أو أكثر فلن يؤثر على المجهر نظرًا لإمكـانية رفـع مصدر الإضاءة إلى أعلى حتى يتوفر المكان المناسب للعينة فوق المسرح، كذلـك بالإمكـان زيادة شدة الإضاءة حسب الحاجة. فلقد أصبح المجهر المقلوب ذا أهمية بالغة في العصر الحديث حيث سهل عملية التصوير المستمر «التصوير السينمائي» وهذا بالطبع مكننا اليوم من معرفة ما يجري بالفعل داخل الخلية الحية من نشاطات حيوية وبالذات الحركية منها.

المجهر متداخل الضوء

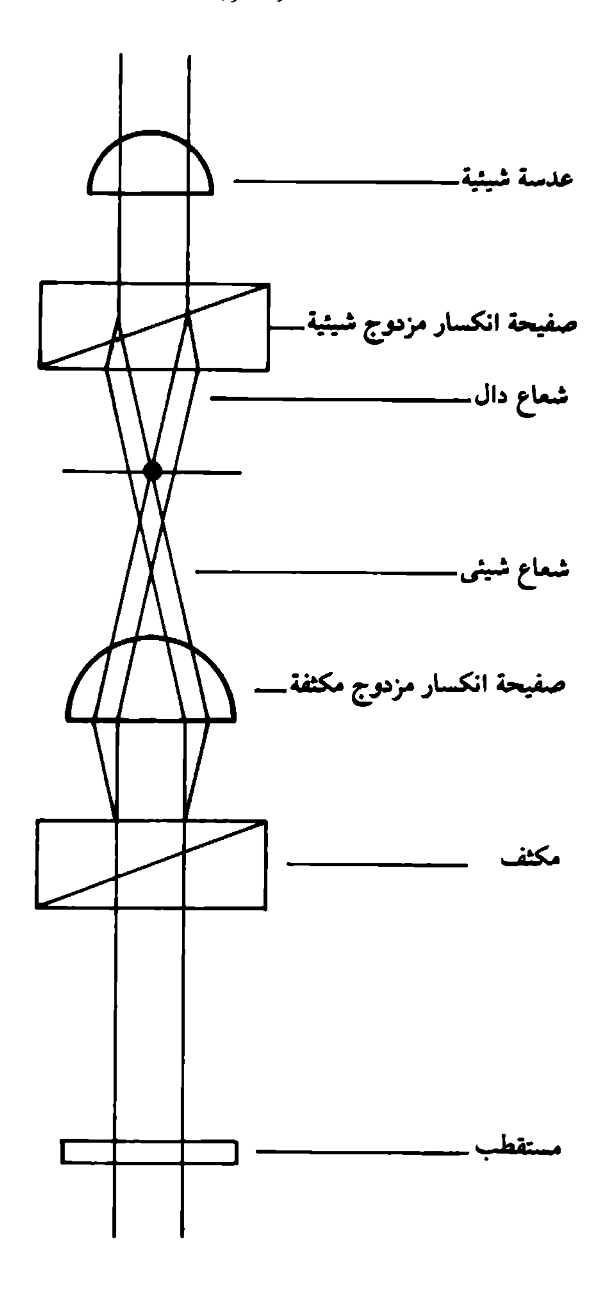
المجهر متداخل الضوء (Interference light microscope) يشبه إلى حد كبير المجهر متباين الطور (Phase contrast microscope) لكنه يستطيع أن يوضح الموجات الضوئية التي حصـل لها اعـاقـة نسبية (Relative retardation) بعد مرورها من خلال العينة الشفافة. وفي الحقيقة يستخدم المجهر متداخل الضوء في قياس مقدار الإعاقة الضوئية والتي بدورها تستغل في الدراسات الكمية (Quantitative studies) أكثر من دراسات المشاهدة (Observation). فعند معرفة سمك العينة المدروسة كالخلية أو عضياتها مثل النواة أو الجسم النسيجي ومعامل انكسار المادة المحيطة بها العينة فإنه بالإمكان حساب معـامـل انكسـار العينـة وبـالتـالي يمكن تقـدير تركيز الأجسـام الصلبة بها ووزنها الجـاف. كما يمكن استخـدام هذا النوع من المجاهر لدراسة العينات على مستواها الخـلوي أو الـنـسـيجـي، لذا يسـميه بعض العلماء الميزان الـدقيق لعلماء الأحياء (Cell biologist's microbalance).

يعتمد هذا المجهر على استقطاب الضوء أولا بوساطة مستقطب (Polarizer) يوجد أمام مصدر الإضاءة. هذا الضوء المستقطب (Polarized light) يشطر الى شعاع رئيسي (Main beam) وشعاع دال (Reference beam) عن طريق صفيحة الانكسار المزدوج

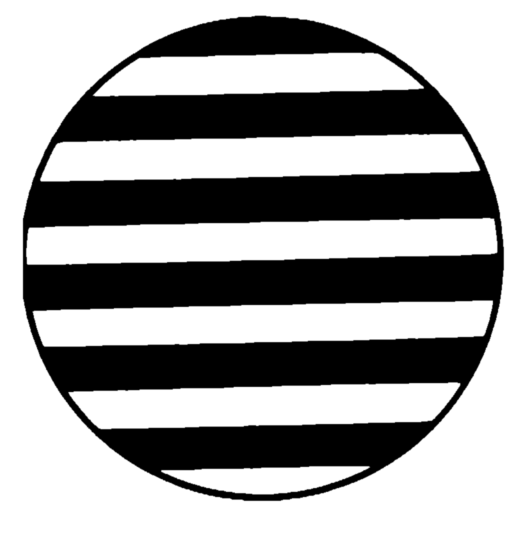
(Birefringent plate) المحمـولة فوق المكثف. صفيحة الانكسار المزدوج هذه تعطي شعـاعـين منفصلين جانبيين لكن اتجـاهي ذبـذباتهما يكونان متعامدين على بعضهما البعض، ويعمـلان زاوية مقدارها ٤٥° مع مستوى تذبذب الضوء المستقطب الذي يدخـل إلى المكثف. وعندما يمر هذان الشعاعان عبر العينة نجد أنهما يجتمعان مرة أخرى بوساطة صفيحة انكسار مزدوج ثانية مثبتة أمام العدسة الشيئية. ونلاحظ أن الجهـاز البصري مركب بحيث يمكن الشعاع الرئيسي من المرور خلال العينة، لذا يسمى أحيانا بالشعاع الشيئي (Object beam) بينما الشعاع الدال (Reference beam) يمر من خلال المساحة المحيطة بالعينة (شكل ٣ ـ ٢٣). أي اختلاف في مسار الشعاع تحدثه العينة المدروسة سوف يؤدي إلى تغيير في طيف الشعاع الرئيسي أو شعاع الشيء. كما أنه بالإمكان الحصول على العديد من الأشرطة السوداء (Black fringes) المتوازية في حقـل الـرؤية (View field) للمجهـر (شكل ٣ ـ ٢٤أ)، وعندما يحدث تغير طيفي للشعاع الرئيسي بعد مروره من خلال العينة، نجد أنه يحدث تغيير جانبي لعدد من الأشرطـة السـوداء نتيجـة التغـير الـذي حدث في طيف الشعـاع الـرئيسي (شكـل ٣ ـ ٢٤ب). كما أنـه بالإمكـان قياس هذا التغـير في الأشرطة السوداء ومنها يمكن حساب مقدار التغير الطيفي الذي نتج من العينة. ولعل أبرز خدمات هذا المجهر تتركز في استخدامه لتقدير كمية الوزن الجافة (الكتلة الجافة Dry mass) للخلايا فمن المعـروف أن معامل الانكسار للخلية مرتبط مباشرة مع تركيز محتوياتها الصلبة، وأن التغير في الطيف الضوئي نتيجة مروره خلال الخلايا مرتبط بمعامل الانكسار وسمك الخلية ذاتها. فلو عرفنا معامل الانكسار وكذلك سمك الخلية فبالاستطاعة حساب تركيز الأجسام الصلبة (الكتلة الجافة) في داخل الخلية من المعادلة الآتية:

$$\text{ك} = \frac{\text{أ} \, . \times \sigma}{\text{١٠٠} \times \text{ث}}$$

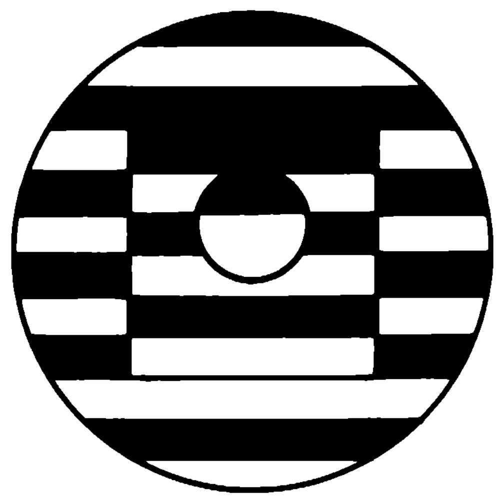
حيث (ك) الكتلة الجافة للخلية و(أ) مساحة الخلية و (σ) مقدار التغير في الطيف (Phase change) و(ث) ثابت يعادل (٠,٠٠١٨).



شكل ٣ ـ ٢٣ : الجهاز البصري في المجهر متداخل الضوء.



ا ـ قبل وضع العينة



ب ـ بعد وضع العينة .

الفصل الرابع

طرق التحضير المجهرية

● مقـدمـة ● طريقة الحصول على العينة
● طريقة تثبيت العينة ● طريقة التحضير
المباشر ● طريقة الهرس ● طريقة السحب
● طريقة التقطيع

مقدمـة

يقصد بالتحضيرات المجهرية أو الدقيقة بأنها تلك الخطوات أو العمليات التي تستعمل فيها معدات أو أجهزة علمية وطرق تحضير دقيقة تسهل على الدارس معرفة ماهية الـتراكيب الخلوية المكـونة لجسم الكائن الحي. على هذا الأساس أصبح من الضروري إذا معرفة طبيعة تلك المعدات أو الأجهزة العلمية، وكذلك الطرق اللازم اتباعها أثناء التحضيرات المجهرية. ولقد سبق الكتابة عن أهم الأجهزة العلمية ذات الصلة الوثيقة بالتحضيرات المجهرية في الفصول السابقة وسوف يخصص هذا الفصل لشرح أهم طرق التحضير الواجب اتباعها أثناء إعداد العينة للفحص المجهري.

تعرف الطرق التحضيرية بأنها تلك الخطوات الواجب اتباعها أثناء إعداد العينة للدراسة كطريقة الحصول عليها ومعالجتها بالمواد الكيميائية والأصباغ حتى يصبح من السهـل دراسـة مكوناتها التركيبية بوساطة المجاهر الضوئية أو الالكترونية. وفي وقتنا الحاضر هذا يصعب حصر جميع الطرق التحضيرية المعروفة وبشكل مفصل واف، لذا نكتفي هنا بالتطرق إلى أكثر الطرق شيوعا في وقتنا الحاضر.

طريقة الحصول على العينة

قد تكون العينة المدروسة عبارة عن كائن حي كامل وقد تكون جزءا من جسم هذا الكائن. وتعتمد كيفية الحصول على العينة أساسا على الهدف المقصود أثناء الدراسة. يفضل دائما أن يعامل الكائن الحيواني الحي بطريقة انسانية أثناء استخدامه في الدراسات التجريبية، وكثير من دول العالم اليوم قد وضعت قوانين واضحة تهدف إلى المعاملة الحسنة بكائنات التجارب ويشذ عن هذا الكائنات النباتية نظرا لأنها لاتبدي أي نوع واضح من الإحساس بالألم. إذا الغرض الحقيقي من معاملة حيوانات التجارب هو تخفيف الألم عنها بقدر المستطاع، فإذا كان الأمر يتطلب قتل الحيوان فيجب أن يتم بسرعة وبشكل مريح وكما ذكر سابقا أن كيفية الحصول على العينة يعتمد على الهدف من البحث فقد تكون العينة كائنا متكاملا، وينطبق هذا على الكائنات الصغيرة كالقراديات، أو جزءا من أعضاء الكائن الخارجية أو الداخلية، وهذا يعني الحاجة إلى القيام بعملية التشريح للحصول على الجزء المطلوب. لهذا نستطيع أن نلخص أهم الطرق المتبعة في الحصول على العينة من الكائن الحيواني كالآتي:

(ا) الذبح	Slaughtering
(ب) التخنيع	Pinthing
(جـ) الضرب على مؤخر الرأس	Blow on the head
(د) التخدير	Anaesthesia

الذبح Slaughtering

تعتبر هذه الطريقة من أسهل العمليات وأسرعها وتطبق على معظم الحيوانات الفقارية إذا استثنينا الأسماك منها. ومن أهم الشروط الواجب اتباعها أثناء الذبح الامساك الجيد بالحيوان واستعمال سكين (Knife) أو شفرة (Blade) حادة جدا وتتم عملية الذبح بقطع أوردة وشرايين الرقبة مع القصبة الهوائية والبلعوم.

التخنيع Pinthing

يقصد بعملية التخنيع، شل الحيوان شلا كاملا وذلك بفصل الحبل الشوكي عن الجهـاز العصبي المركزي أو المخ لكي ينقطع اتصال السيالات العصبية عن مختلف أجزاء جسم الكائن مع المخ وهكذا يفقد الحيوان الإحساس بالمؤثرات الخارجية ومن بينها الإحساس بالألم أثناء عملية التشريح للحصول على العينة. وتتم عملية التخنيع بغرز ابرة التشريح الحادة فيما بين الفقرة الأولى من الفقرات العنقية والجمجمة حتى تصل إلى الحبل الشوكي ثم تحرك هذه الأبرة يمنة ويسرة حتى نضمن الانفصال التام للحبل الشوكي عن الجهاز العصبي المركزي. وكثيرا ما يطبق على الضفادع.

ضرب مؤخرة الرأس Blow on the Head

هذه الطريقة تناسب حيوانات المعمل الصغيرة كالضفادع والفئران، وتهدف إلى عمل ارتجاج مخي مفاجىء وبشكل سريع بحيث يصبح الحيوان بعدها في حالة غيبوبة تامة. تتم هذه العملية بالإمساك الجيد بالحيوان بحيث تكون الناحية البطنية باتجاه الباحث مع ترك منطقة العنق والرأس حرة الحركة ثم يضرب بمؤخرة الرأس الخلفية وبشكل سريع ومفاجىء على أي جسم صلب كحافة الطاولة.

يجب أن يتم الارتجاج المخي بضربة واحدة فقط لهذا ننصح بعدم التردد أو الخوف والا يتألم الحيوان. ويعرف نجاح العملية في حالة الفأر بخروج الدم من فتحتي الأنف.

التخدير Narcotisation

يجب أن يقوم بعملية التخدير أشخاص مؤهلون للقيام بمثل هذه المهمة، نظرا للأخطار الجسيمة التي قد تنتج عن سوء استخدام المخدرات. وتتوقف عملية اختيار المخـدر المنـاسب على طبيعة البحث ونوع الحيوان. فمن المعروف أنه في الدراسات الخلوية (Cytological studies) يفضل عدم استعمال المخدرات بينما تستعمل في حالة دراسـة كيفية قيام الأعضاء بوظائفها (Physiological studies) وفي بعض الدراسات النسيجية (Histological studies). كذلـك من المعـروف أن هنـاك مخدرات تنـاسب

الحيوانـات المـائية مثـل الايثانول وكلوريد المنجنيز والمنثول، وهناك مخدرات تناسب الحيوانات اللافقارية مثل أبخرة الاثير. أما البرمائيات والزواحف فبالإمكان تخديرها طبيعيا وذلك بتعريضها لدرجة منخفضة جدا، فقد تصل إلى ٢٠°م تحت الصفر. لهذا يجب تحديد نوع المخـدر اللازم استخدامه على حسب طبيعة العمل ونوع الكائن، وسيأتي الشرح بشيء من التفصيل عن المخدرات وكيفية استعمالها في الباب الثالث من هذا الكتاب.

طريقة تثبيت العينة Fixation Method

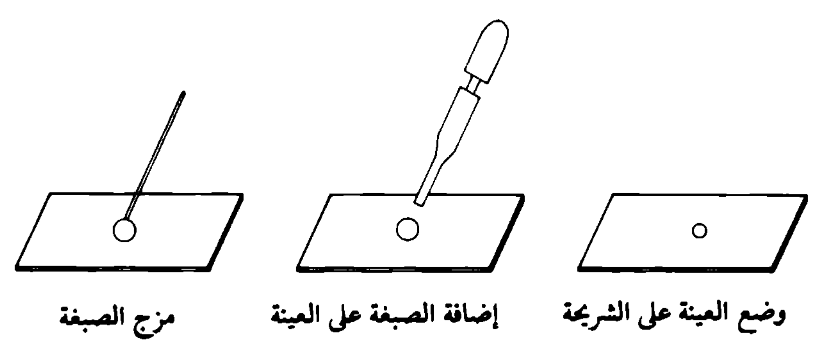
إن الغـرض الأسـاسي من التثبيت هو المحافظة على طبيعة التراكيب النسيجية والخلوية إلى أكـبر قدر ممكن على طبيعتهـا الأصلية مما يستـوجب الكبح أو الحد من التغيرات التي تحصل بعد الوفاة بأسرع فرصة ممكنة، ولكي تصمد للعمليات التي تمر بها أثناء الإعداد للدراسة مثل التقطيع والصبغ. الجدير بالمعرفة أنه لا يوجد مثبت مثالي يناسب جميع الأغراض بل تحدد الدراسة نوع المثبت الواجب استعماله. فمن المعروف أن الدراسات الخلوية يتفادى فيها استعمال المثبتات المخثرة القوية، لأنها تحطم الكثير من الـتراكيب السيتوبلازمية لكن يفضل استخدام المثبتات الغير مخثرة مثل كرومات البـوتـاسيوم الثنـائية أو رابع أكسيد الأزميوم. في الدراسات النسيجية فيفضل عادة استخدام مثبتات مخثرة قوية، لأنها تجعل النسيج في حالة تساعد على عمليات التقطيع والصبغ، ولأن التراكيب السـيتوبلازمية الدقيقة تكون غير ذات أهمية عظمى. وبما أن المثبتـات تنفـذ وتتفـاعـل مع الأنسجة عند سرعات مختلفة تبعا لنوع المثبت وسمك النسيج، لذا يجب تصغـير حجم العينة المراد تثبيتها بحيث لا تزيد عن القليل من المليمـترات (٢ ـ ٤ مم) كلما كانت سرعة نفاذ المثبت بطيئة كلما وجب تصغير حجم العينـة. الأعضاء المجوفة مثل الأمعاء (Intestines) يجب أن تفتح حتى يغمر المثبت بالتساوي جميع أجزائها. كذلك يجب أن تتم عملية التشريح أثناء الحصول على العينة بأسرع وقت ممكن حتى يحد من التغـيرات الخلوية التي تحصل بعد الوفاة. أما مدة التثبيت المثـالية فيجب أن تحدد بالقيام بالعـديد من التجـارب كما أن كمية المثبت المستعملة يجب أن تكون أكبر بحوالي ٢٠ مرة من العينة المثبتة. وتلعب درجة الحرارة

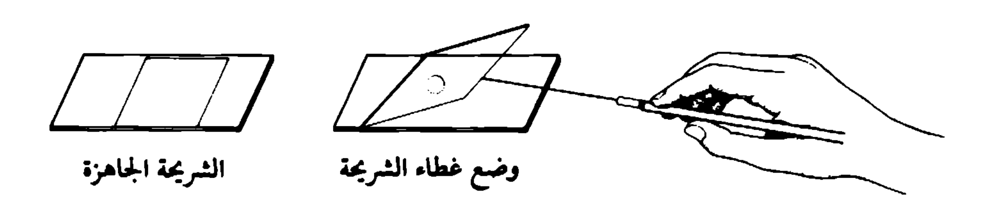
دورا هاما في عملية التثبيت لكن معظم المثبتات النسيجية يمكن استعمالها عند درجة حرارة الغرفة. ويمكن تثبيت العينة بالحرارة العالية كما هي الحال عليه في دراسة الكروموسومات أو بالتبريد المنخفض كما في الدراسات الإنزيمية. ولقد شرحت المثبتات وكيفية تحضيرها بشيء من التفصيل في الباب الثالث من هذا الكتاب.

طريقة التحضير المباشر Direct Preparation Method

يستعمل هذا النوع من التحضير في حالة الدراسة السريعة للعينات (Specimens) الحية ولوقت قصير جدا كما هي الحال في فحص الخلايا الحرشفية (Squamous cells) المبطنة للفم أو فحص بعض الأوليات (Protozoa) مثل الأميبا (Amoeba) واليوجلينا (Euglena) والبرامسيوم (Paramecium) والكائنات الحية الأخرى مثل البكتريا (Bacteria) والفطريات (Fungi). تتم العملية بوضع قطرة صغيرة من المحلول المائي الذي يحتوي على العينة في وسط شريحة زجاجية مجهرية نظيفة ثم تضاف قطرة صغيرة من أي صبغة بسيطة مثل صبغة أزرق المثيلين (Methylene blue). تحرك المحتويات جيدا بقضيب زجاجي رفيع ثم يوضع غطاء الشريحة على النقطة المائية، ولكن بشرط عدم السماح إطلاقا بتكون أي فقاعات هوائية (Air-bubles) قد تسبب في جفاف العينة وبشكل سريع. يمكن وضع غطاء الشريحة بإحدى طريقتين الأولى يوضع فيها الغطاء بجانب القطرة المائية وبشكل مائل وبشرط أن يرتكز على ابرة التشريح مثلا ثم يسمح للغطاء بالانخفاض باتجاه القطرة المائية حتى يلامسها تماما. تستمر عملية حفظ الغطاء بمساعدة إبرة التشريح وببطء وحذر شديدين حتى يصبح الغطاء في وضعه الأفقي وتنبسط القطرة المائية تحت هذا الغطاء. أما الطريقة الثانية فيمسك فيها غطاء الشريحة بين السبابة والابهام فوق القطرة المائية بقليل، ثم يسمح له بالسقوط المباشر على القطرة مما يؤدى إلى انبساطها مع عدم تكون أية فقاعات، لكن هذه الطريقة غير مضمونة وتحتاج إلى عملية مران وتدريب. وحتى لا تجف الشريحة بسرعة وبالذات في الأجواء الحارة يفضل أن توضع طبقة من الفازلين (Vaseline) أو الجيلاتين (Gelatin) أو شمع البرافين (Paraffin) حول حواف غطاء الشريح، وهذا يكبح عملية التبخر للمحلول المائي تحت الغطاء. الجدير بالذكر أن هذا النوع من الشرائح لا يمكن حفظها لفترة

طويلة من الزمن لكنها تناسب الدراسة لفترة قصيرة تصل عدة ساعات فقط (شكل ٤ - ١).

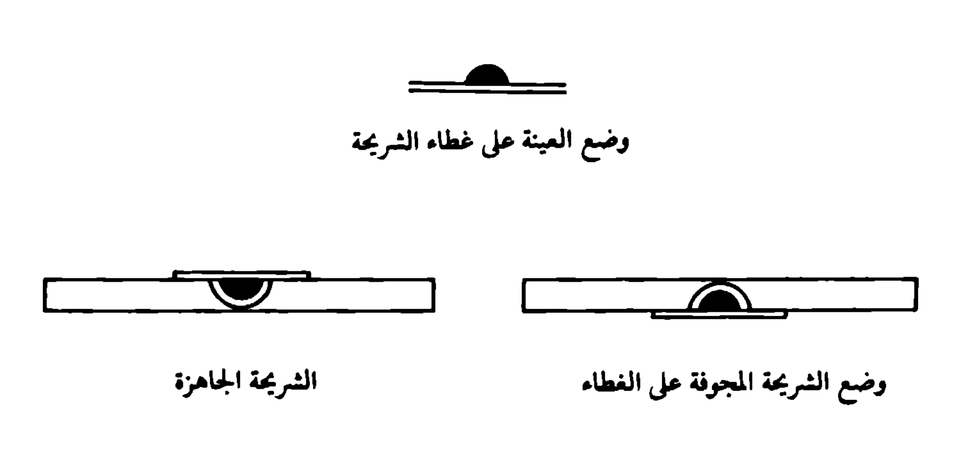




شكل ٤ - ١ : رسم تخطيطي لطريقة التحضير المباشر.

في حالة دراسة البكتريا والأوليات وبالذات عند الرغبة في ملاحظة كيفية الحركة أو طريقة انقسام هذه الكائنات مباشرة يمكن استخدام طريقة أخرى تعرف باسم طريقة القطرة المعلقة (Hanging drop method). في هذه الطريقة توضع قطرة صغيرة جدا من المحلول المائي الذي يحتوي على الكائن الحي المجهري (Living micro-organism) في وسط غطاء الشريحة المجهرية والذي بدوره يعكس عليه شريحة مجهرية تحتوي على تجويف (Cavity) مركزي وتعرف باسم الشريحة المقعرة (Depression slide). تعاد الشريحة المجهرية الى الوضع العادي وبشرط أن تبقى القطرة المائية معلقة بسطح غطاء الشريحة في وسط تجويف الشريحة المقعرة تماما. ويفضل أن

تكون حواف تجويف الشريحة المقعرة مدهونة مسبقا بالفيزالين لكي تساعد على التصاق غطاء الشريحة وتحد من عملية التبخر وبالتالي من جفاف العينة بسرعة. أما إذا لم تتوفر الشريحة المقعرة فإنه بالإمكان استخدام حلقة فانتجيم (Vantegham ring) وهي عبارة عن حلقة زجاجية صغيرة تشبه الخاتم تثبت بواسطة البرافين في وسط الشريحة المجهرية العادية ومن ثم تغطى بواسطة غطاء الشريحة المحتوي على القطرة المائية المعلقة (شكل ٤ ـ ٢).



شكل ٤ ـ ٢ : رسم تخطيطي لطريقة القطرة المعلقة.

تحضير الخلايا الحرشفية بالطريقة المباشرة

تعتبر الخلايا الحرشفية (Squamous cells) الطلائية المبطنة للفم في الانسان من أنسب الخلايا الحيوانية للدراسة بهذه الطريقة وكما هو متبع في التحضيرات المجهرية، فإنه قبل كل عملية تحضير يجب معرفة جميع المواد والمعدات وكذلك خطوات العمل اللازم استخدامها وتطبيقها أثناء القيام بالتجربة.

المواد والمعدات

(١) شرائح مجهرية
(٢) أغطية شرائح
(٣) نكاشات أسنان
(٤) صبغة أزرق المثيلين
(٥) قطارة
(٦) قضيب زجاجي
(٧) فازلين
(٨) إبرة تشريح
(٩) مجهر ضوئي
(١٠) ماء مقطر.

خطوات العمل

١ ـ توضع قطرة صغيرة من الماء المقطر في وسط الشريحة المجهرية النظيفة.

٢ ـ يحك ولعدة مرات بطانة التجويف الفمي بعد المضمضة بوساطة النهاية المستعرضة لنكاشة الأسنان حتى يتحصل على كمية لا بأس بها من الخلايا الحرشفية المبطنة للجدار التي عادة من السهل إزالتها بالحك البسيط، يعرف ذلك بتراكم مادة بيضاء اللون على رأس النكاشة. وللحصول على خلايا حية يفضل أن يغسل الفم بالماء المقطر بعدها توضع اليد اليسرى على جدار الخد الأيسر من الخارج وبالنكاشة في اليد اليمنى، يحك جدار الخد الأيسر من الداخل مع الضغط. وبذلك يضمن الحصول على كمية مناسبة من الخلايا الحية.

٣ ـ تحرك نهاية النكاشة في قطرة الماء الصغيرة الموجودة على الشريحة المجهرية، حتى تتعلق الخلايا الحرشفية تماما في تلك القطرة المائية.

٤ ـ تضاف قطرة صغيرة جدا من صبغة أزرق المثيلين بالقطارة.

٥ ـ تمزج القطرة المائية مع قطرة الصبغة جيدا باستعمال القضيب الزجاجي، حتى يصبح لون المحلول متجانس.

٦ ـ يوضع غطاء الشريحة بالقرب من محلول العينة وبمساعدة إبرة التشريح، ينزل الغطاء بالتدريج حتى ينطبق تماما على الشريحة المجهرية، وينبسط المحلول تماما مع عدم تكون أية فقاعات هوائية. يجب أن يتناسب حجم المحلول مع غطاء الشريحة فإذا كان الحجم قليلا فيستعمل غطاء شريحة صغير والعكس صحيح.

٧ ـ يفضل أن تدهن حواف غطاء الشريحة من الخارج بكمية كافية من مادة الفزالين إذا كان الجوحارا، وذلك باستخدام نكاشه أسنان نظيفة لكي تكبح من عملية التبخر الناتجة عن الارتفاع في درجة الحرارة.

٨ ـ تفحص الشريحة بوساطة المجهر باستخدام العدسات الشيئية الجافة فقط (Dry objective lenses).

تحضير بعض الأوليات الطفيلية بالطريقة المباشرة

الأوليات (Protozoa) عبارة عن كائنات حيوانية وحيدة الخلية، ويوجد منها أنواع حرة المعيشة (Free Living) ، وأنواع طفيلية المعيشة (Parasitic living) ، تعتمد في الحصول على غذائها إما من الحيوان أو النبات. هذه الأنواع الطفيلية بعضها ضار، وتسبب الكثير من الأمراض، والبعض الآخر غير ضار. وتحتوي أمعاء البرمائيات وبالذات الضفادع على عدة أجناس من الكائنات الأولية الطفيلية التي تعتبر من أنسب المصادر للدراسة نظرا لسهولة الحصول عليها.

المواد والمعدات

(١) ضفدعة
(٢) كأس زجاجية صغيرة
(٣) أدوات تشريح
(٤) محلول كلوريد الصوديوم (٠,٥٪)
(٥) صبغة أزرق الميثلين
(٦) فازلين
(٧) دبابيس.
(٨) شرائح مجهرية
(٩) أغطية شرائح
(١٠) قطارات
(١١) قضيب زجاجي
(١٢) مجهر ضوئي
(١٣) طبق تشريح

خطوات العمل

١ ـ تمسك الضفدعة جيدا من أطرافها الخلفية، ثم يضرب بمؤخرة رأسها وبشدة على حافة الطاولة، حتى تصبح في حالة غيبوبة تامة (أنظر ص٦١).

٢ ـ تثبت الضفدعة في طبق التشريح بالدبابيس على ناحيتها الظهرية، ثم يفتح التجويف البطني بسرعة وتعزل القناة الهضمية، ويفصل المستقيم (Rectum) عن بقية الأمعاء.

٣ ـ يوضع المستقيم في كأس زجاجية صغيرة بها حوالي ١٠ مل من محلول كلوريد الصوديوم ٠,٥٪، ويفتح المستقيم بالمقص، ثم يحرك جيدا في المحلول الملحي، بعدها يبعد المستقيم ويحفظ المحلول حتى تترسب مخلفات الطعام في أسفل الكأس. توضع قطرة صغيرة من هذا المحلول الرائق في وسط الشريحة المجهرية.

٤ ـ تضاف قطرة صغيرة جدا من صبغة أزرق الميثلين بالقطارة، ثم تتبع بقية الخطوات كما وردت في التجربة السابقة (ص ٦٦).

تحضير خلايا الخميرة بطريقة القطرة المعلقة

خلايا الخميرة (Yeast) هي عبارة عن كائنات نباتية فطرية (Plant fungi) ووحيدة خلية مجهرية (Unicellular microorganisms) وتعتبر خميرة سكاروميسز بومبي (*Saccharomyces pombe*) التي يستعملها أصحاب المخابز وربات البيوت في المطابخ، نوع من أنواع الخميرة والتي من السهل الحصول عليها واستخدامها في التجارب المعملية.

المواد والمعدات

(١) شرائح مقعرة
(٢) أغطية شرائح
(٣) صبغة أزرق الميثلين
(٤) قطارات
(٥) أنابيب اختبار
(٦) خميرة جافة
(٧) سكر
(٨) ماء مقطر
(٩) فازلين
(١٠) مجهر ضوئي.

خطوات العمل

١ ـ يوضع حوالي ١٠ مل ماء مقطر في انبوبة اختبار نظيفة.

٢ - يضاف إلى الأنبوبة حوالي $\frac{1}{2}$ جم من السكر.

٣ - يضاف إلى الأنبوبة حوالي $\frac{1}{2}$ جم من الخميرة الجافة.

٤ - ترج الأنبوبة جيدا حتى تتعلق الخميرة.

٥ - تترك الأنبوبة لمدة ٣٠ إلى ٦٠ دقيقة لتتمكن الخلايا من النمو والتكاثر على هذا المحلول السكري.

٦ - تضاف بضع قطرات من صبغة أزرق الميثلين ويحرك المحلول جيدا.

٧ - توضع قطرة صغيرة من هذا المحلول في وسط غطاء شريحة نظيفة.

٨ - تدهن الحواف الخارجية للتجويف المركزي الموجود في الشريحة المقعرة بقليل من الفازلين، ثم تقلب هذه الشريحة المقعرة على غطاء الشريحة بشرط أن تكون القطرة المائية في وسط التجويف تماما.

٩ - يضغط قليلا على الشريحة حتى يلتصق الغطاء بها.

١٠ - تعاد الشريحة المقعرة الى الوضع الطبيعي، مع التأكد بأن القطرة المائية ما زالت معلقة في غطاء الشريحة.

١١ - تدهن الحواف الخارجية للغطاء بقليل من مادة الفازلين حتى تحد من عملية التبخر.

١٢ - تفحص الشريحة تحت المجهر باستعمال العدسات الشيئية الجافة ويمكن استخدام العدسات الزيتية، مع الأخذ في الاعتبار الحذر الشديد لمنع تحرك غطاء الشريحة.

طريقة الهرس Squashing Method

تعتمد هذه الطريقة على هرس (Squash) العينات الرخوة (Soft) وتحويلها من الحالة النسيجية (Tissue state) إلى الحالة الخلوية (Cellular state) مباشرة على الشريحة المجهرية. تتم عملية الهرس ميكانيكيا وذلك بالدق اللطيف على العينة في قليل من محلول الصبغة باستعمال قضيب زجاجي (Glass rod)، أو بالنهاية الخلفية لإبرة التشريح. بعدها يجب أن تزال جميع الأجزاء الكبيرة التي يمكن رؤيتها بالعين المجردة، ثم يوضع غطاء الشريحة بحذر شديد مع عدم السماح بتكون أية فقاعات هوائية تحت

هذا الغطاء حتى لا تجف العينة بسرعة. ويضغط جيدا بإبهام اليد على غطاء الشريحة حتى تلتصق الخلايا وتصبح أكثر انبساطا على الشريحة، لكن يجب الحذر في عدم السماح للغطاء بالتحرك إطلاقا أثناء عملية الضغط وإلا تكسرت الخلايا وتشوهت معالمها الحقيقية.

إن عدم إزالة جميع الأجزاء الكبيرة سوف يساعد على تكون الفقاعات الهوائية تحت غطاء الشريحة، وكذلك يقلل من انبساط الخلايا على الشريحة المجهرية، مما يؤدى إلى عدم وضوح تركيبها الداخلي بشكل جيد. الجدير بالذكر أن هذه الطريقة تعتبر من أنجح الطرق المختصة بدراسة الخلايا وبالذات دراسة مراحل الانقسام الخلوية.

لهذا يجب معرفة أهم القواعد الأساسية في عمليات الهرس:

ا - يفضل دائما تثبيت العينة في مثبت كارنوي حديث التحضير نظرا لأن المثبت قديم التحضير يحتوي على نسبة عالية من خلات الاثيل (Ethyl acetate) ذات التأثير السيء على الخلايا. كذلك يجب أن يكون حجم العينة صغيرا ولا يزيد عن ٣ مم وكمية المثبت كثيرة. كما يفضل أن لا تزيد مدة التثبيت عن الحد المناسب لتفادي تصلب الأنسجة. تحتاج الأنسجة المختلفة إلى فترات تثبيت متفاوتة، فمثلا تحتاج أنسجة البرمائيات والحشرات إلى بضع ساعات حتى تتم عملية التثبيت، لكن مدة التثبيت المناسبة للغدد اللعابية في الحشرات ثنائية الأجنحة لا تتطلب أكثر من بضع دقائق ولا تزيد عادة عن ٣٠ دقيقة. على العموم يمكن ترك العينة في المثبت لمدة ليلة كاملة بشرط خزنها عند درجة حرارة ٤°م. أما العينات المثبتة لعدة أيام فعادة تكون قاسية يصعب هرسها وامتزاجها بالأصباغ.

ب - يوجد ثلاثة أصباغ مشهورة في مجال الهرس هي خلات الكارمين (Aceto-carmine) وخلات الأورسين (Aceto-orcein) وصبغة فولجن (Feulgen). تتم عملية الصبغ عادة أثناء عملية الهرس لكن بالإمكان هرس العينة في ٤٥٪ حمض خليك، بعدها يفصل غطاء الشريحة ثم تصبغ الخلايا نظرا لأن بقاء العينة في محلول الصبغة قد يزيد من صلابتها، وبالتالي صعوبة هرسها، لكن إذا استثنينا الغدد اللعابية

في ثنائية الأجنحة والخصي في حشرات النطاط، نجد أن معظم أنسجة الحيوان تصبغ مبـاشرة على الشريحـة المجهـرية، حيث توضع قطرة من محلول الصبغة على النسيج الخلوي ثم بالدق اللطيف يتم تحويل العينة من مستواها النسيجي إلى مستواها الخلوي قبل عملية وضع غطاء الشريحة على الخلايا.

جـ ـ يجب التأكد من إزالة جميع الأجزاء الكبيرة نسبيا والتي ترى بالعين المجردة، لأنها تعيق عملية الفرد الجيد للخلايا، مما يؤدي إلى سوء التحضير. كما يفضل استعمال غطاء شريحـة سميك يتحمـل عمليات الضغط ويستحسن أن يكون قد طلي مسبقا بمحلول السيليكون (تخزن هذه الأغطية في ٩٥٪ كحول اثيلي، لكن يجب تجفيفها تماما قبـل عملية الاستعمال). كذلك يستحسن استعمال شرائح مجهرية مدهونة بمحلول الألبيومـين أو ما يعـرف بالشرائح المطلية (Subbed slides) ، وهي عبارة عن شرائح مجهـرية سبق وأن غمـرت في محلول من الجيلاتـين (Gelatin) وكـبريتات البوتاسيوم الكرومية البوتاسية (Chromium potassium sulphate) ، بنسبة ١جم و١ , ٠ جم لكل لتر واحد على التوالي. الهدف من استخدام مثل هذه الشرائح زيادة نسبة الالتصاق الخلوي على الشرائح المجهرية والحد من نسبة الالتصاق على أغطية الشرائح المطلية بالسليكون.

د ـ بعد وضع غطاء الشريحة على الخلايا، يجب التأكد من عدم تكون أية فقاعات هوائية. عندما توضع الشريحة في داخل ورقة ترشيح مثنية إلى نصفين ثم يضغط بابهام اليد وبشكل جيد مع عدم السماح للغطاء بالتحرك اطلاقا حتى لا تتلف الخلايا.

تعتبر هذه الخطوة بمثابة الخطوة الرئيسية في عمليات الهرس حيث يعزى إليها جودة التحضير فكلما كان الضغط قوي وثابت كلما كانت النتيجة أوضح.

أما أشهر طرق الهرس المتعارف عليها في مجال الدراسات الحيوية فمنها:

تحضير أطوار الانقسام غير المباشر في الحيوان

تعتبر طريقة تحضير أطوار الانقسام غير المباشر (Mitosis) لخلايا الحيوان من أكبر

المشـاكل نظرا لصعوبة الحصول على هذا النوع من الانقسام من أنسجة الحيوانات البالغة. لكن تعتبر البيوض الملقحة، وبالذات تلك التي تكون في مراحل الانقسام التفلجي (Cleavage division) وبخاصة بيوض الجراد والنطاط بشكل عام، من أحسن المصادر لدراسة مثل هذا النوع من الانقسام الخلوي.

المواد والمعدات

(١) بيض نطاط أو جراد
(٢) أدوات التشريح
(٣) ٥٪ صبغة خلات الأورسين
(٤) ثلج جاف
(٥) مثبت كارنوي
(٦) ماء مقطر.
(٧) شرائح مجهرية
(٨) أغطية شرائح.
(٩) ورق ترشيح
(١٠) ايوبارال
(١١) ٩٥٪ كحول إثيلي
(١٢) موقد كحولي
(١٣) مجهر ضوئي
(١٤) زجاجة ساعة
(١٥) مجفف شرائح

خطوات العمل

١ ـ تنظف البيوض جيدا من حبات الرمل وذلك بغسلها في الماء المقطر لعدة مرات مع استخدام فرشاة التشريح الناعمة.

٢ ـ توضع بيضة واحدة في وسط الشريحة المجهرية ثم تضاف قطرة إلى قطرتين من الماء المقطر وتفتح القمة الأمامية للبيضة بوساطة ابرة التشريح الرفيعة.

٣ ـ يضغط بالملقط على النهاية الخلفية للبيضة حتى تخرج محتوياتها الداخلية بما فيها الجنين والذي يمتاز بلونه الأبيض الشفاف.

٤ ـ يجفف الماء بسرعة باستخدام ورق الترشيح، مع عدم التعرض للجنين.

٥ ـ تضاف بضع قطرات من مثبت كارنوي حديث التحضير وينتظر حوالي خمس دقائق.

٦ ـ يجفف المثبت بورق الترشيح مع عدم التعرض للجنين.

٧ ـ تضاف قطرة إلى قطرتين من الصبغة وتترك الخلايا تصطبغ جيدا، وهذا يعتمد على تركيز الصبغة ومدة الصبغ ويكفي لذلك عادة عشر دقائق، لكن يجب عدم السماح للصبغة بالجفاف إطلاقا لذا يفضل أن تغطى الشريحة بزجاجة الساعة مثلا حتى لا تتبخر الصبغة. يمكن إضافة زيادة من الصبغة إذا تطلب الأمر ذلك، لأن جفاف الصبغة يؤدي إلى جفاف الخلايا وبالتالي إلى عدم صلاحيتها للدراسة.

٨ ـ يوضع غطاء الشريحة بحذر مع عدم السماح لتكون أي فقاعات هوائية تحت الغطاء ويفضل أن يكون هذا الغطاء سميكا ومطلى بمحلول السليكون.

٩ ـ توضع الشريحة والغطاء إلى الأعلى في داخل ورقة ترشيح مثنية إلى نصفين، ويضغط بلطف على ورقة الترشيح حتى تبين معالم حدود غطاء الشريحة نظرا لامتصاصها لقليل من محلول الصبغة.

١٠ ـ يضغط بابهام اليد على غطاء الشريحة وبشدة ولمدة دقيقة على الأقل ولكن يجب الحذر الشديد من السماح للغطاء بالتحرك أثناء الضغط عليه حتى لا تتلف الخلايا. يمكن تكرار العملية عدة مرات ويفضل أن تمرر الشريحة وبسرعة من ثلاث إلى أربع مرات فوق موقد كحول قبل كل عملية ضغط. هذه الخطوة ضرورية لفرد الخلايا جيدا مما يساعد على زيادة التصاقها على الشريحة. إذا حدث أن تكونت فقاعات هوائية بعد عملية الضغط فهذه سوف تؤدي إلى جفاف الخلايا بسرعة.

١١ ـ في حالة الرغبة في زيادة ملامح الخلايا يفضل استخدام ما يعرف بعملية الصبغ المضاد (Counter staining) وذلك بصبغ الخلايا بصبغة أخرى تعطي لونا يخالف لون الصبغة الأولى مثل صبغة الأخضر الفاتح (Light green) هذه الصبغة تلون سيتوبلازم الخلايا باللون الأخضر بينما صبغة خلات الأورسين تلون أنوية وكروموسومات الخلايا باللون الأحمر. تتم عملية الصبغ هذه بوضع قطرة من صبغة الأخضر الفاتح عند أحد حواف غطاء الشريحة من جهة وسحب صبغة خلات الأورسين تحت الغطاء بمساعدة ورقة ترشيح توضع عند حافة الغطاء من الجهة المقابلة، وينتظر حتى تحل صبغة الأخضر الفاتح محل صبغة الأورسين تماما وبعدها تعاد عملية الضغط من جديد.

١٢ ـ في حالة الخوف من جفاف الشريحة بسرعة شديدة وبالذات في الأجواء

الحارة، يفضل دهن حواف غطاء الشريحة من الخارج بأية مادة عازلة للتبخر مثل مادة البرافين أو الفازلين، فمن المعروف أن تحضيرات مثل هذه الشرائح لا يمكن استعمالها إلا لفترات محدودة وفي غضون ساعات فقط.

١٣ ـ عند الرغبة في عمل شريحة مستديمة (Permanent)، وبالذات إذا كان التحضير جيدا، توضع الشريحة والغطاء إلى أعلى فوق سطح من الثلج الجاف (Dry-ice) لمدة ثلاث دقائق بعدها ينكش الغطاء وبسرعة بوساطة شفرة الحلاقة أو إبرة التشريح ثم تغطس الشريحة بسرعة في ٩٥٪ كحول اثيلي لمدة دقيقة إلى دقيقتين.

توضع قطرة من محلول الايوبارال (يستعمل هذا بدلا عن بلسم كندا نظرا لامكانية نقل الشريحة من ٩٥٪ كحول إلى مادة التحميل مباشرة) بعدها يوضع غطاء الشريحة الجديد وتترك الشريحة لتجف تماما على مجفف الشرائح. عملية التبريد الشديد بالثلج الجاف عملية ضرورية لكي تتجمد الخلايا مع محلول الصبغة جيدا، ومن ثم تلتصق على سطح الشريحة فيسهل في النهاية نزع غطاء الشريحة مع بقاء معظم الخلايا على الشريحة. كذلك يجب أن تتم عملية نزع الغطاء بسرعة شديدة قبل أن ترتفع درجة حرارة الشريحة.

تحضير أطوار الانقسام الاختزالي في الحيوان

تعتبر عملية تحضير أطوار الانقسام الاختزالي (Meiosis) في الحيوان وبخاصة في ذكور الحيوانات، أسهل من عملية تحضير أطوار الانقسام غير المباشر نظرا لسهولة الحصول على مثل هذا النوع من الانقسام. فمن المعروف أن الانقسام الاختزالي يتم في اعضاء التناسل الأنثوية والذكرية على السواء (المبايض والخصي) لكن ليونه الخصي (Testis) جعلتها أكثر ملاءمة لعمليات التحضير. حيوانات المعمل الثديية الصغيرة والبرمائيات ونطاط الحشائش (Grass hopper) والجراد تعتبر من أنسب الكائنات الحيوانية لدراسة مراحل الانقسام الاختزالي لأن خلاياها تمتاز بكروموسومات قليلة العدد وكبيرة الحجم.

تحضير أطوار الانقسام الاختزالي في البرمائيات

تمتاز البرمائيات (Amphibia) وبخاصة رتبة الذيليات (Urodele) مثل حيوان النيوت (Newt) ورتبة اللاذيليات (Anura) مثل الضفدعة (Frog) ، بأن خلاياها ذات كروموسومات كبيرة وقليلة في العدد مما يجعلها من أنسب المصادر لدراسة مراحل الانقسام الاختزالي.

المواد والمعدات

(١) حيوان برمائي (ضفدعة)
(٢) أدوات تشريح
(٣) مثبت كارنوي
(٤) ماء مقطر
(٥) شرائح
(٦) أغطية شرائح
(٧) ٩٥٪ كحول اثيلي
(٨) موقد كحولي
(٩) مجهر ضوئي
(١٠) طبق بترى
(١١) مجفف شرائح
(١٢) ايوبارال
(١٣) ثلج جاف
(١٤) ورق ترشيح
(١٥) صبغة خلات الأورسين ٥٪
(١٦) أنبوبة اختبار
(١٧) قضيب زجاجي
(١٨) زجاجة ساعة

خطوات العمل

١ ـ يخدر الحيوان وذلك بضرب مؤخرة رأسه بسرعة وشدة على حافة الطاولة.

٢ ـ يفتح تجويف البطن وتعزل الخصية.

٣ ـ تقطع الخصية إلى أربع قطع صغيرة، ثم توضع في أنبوبة اختبار تحتوي على ٨مل من مثبت كارنوي حديث التحضير.

٤ ـ تترك الخصية في المثبت لمدة ساعة إلى ساعتين (½ ساعة قد تكون كافية).

٥ ـ يوضع جزء صغير من نسيج الخصية في وسط شريحة مجهرية نظيفة، ثم تضاف إليه قطرتان من صبغة خلات الأورسين.

٦ ـ تهرس الخصية بالقضيب الزجاجي وبلطف حتى تتحول من الحالة النسيجية

إلى الحالة الخلوية، مدة الهرس يفضل ألا تزيد عن الخمس دقائق.

٧ ـ تزال جميع الأجزاء الكبيرة التي يمكن أن ترى بالعين المجردة بمساعدة الملقط وابرة التشريح.

٨ ـ يغطى المحلول الخلوي بزجاجة الساعة تترك الخلايا تصطبغ جيدا لمدة ١٠ دقائق. (التغطية بزجاجة الساعة عملية ضرورية، الغرض منها الحد من تبخر الصبغة).

٩ ـ تكرر نفس الخطوات ٨ ـ ١٣ المذكورة آنفا في تحضير أطوار الانقسام غير المباشر في الحيوان.

تحضير أطوار الانقسام الاختزالي في الحشرات

يعتبر نطاط الحشائش (Grass hoppers) والجراد (Locust) من أنسب المصادر لدراسة الانقسام الاختزالي لسهولة تربيتها في المعمل ولما تمتاز به من كروموسومات كبيرة وقليلة.

المواد والمعدات

(١) نطاط حشائش ذكر
(٢) أدوات تشريح
(٣) ماء مقطر
(٤) شرائح مجهرية
(٥) أغطية شرائح
(٦) مثبت كارنوى
(٧) أنبوبة اختبار
(٨) ورق ترشيح
(٩) ايوبارال
(١٠) ٩٥٪ كحول اثيلي
(١١) موقد كحولي
(١٢) مجهر ضوئى
(١٣) زجاجة ساعة
(١٤) مجفف شرائح
(١٥) محلول رنجر للجراد
(١٦) ماصات باستير
(١٧) صبغة الأسيتو أورسين
(١٨) ٤٥٪ حمض خليك
(١٩) ٧٠٪ كحول اثيلي

خطوات العمل

١ ـ يمسك النطاط من الناحية الصدرية بملقط، ويغمس في زجاجة ساعة تحتوى على محلول رنجر للجراد (Locust Ringer) ثم بالمقص تقطع النهاية الخلفية للبطن. يُشرَّح الحيوان من الناحية الظهرية وذلك بالقطع طوليا في الخط نصف الظهري.

٢ ـ تعزل الخصيتان بالملقط، وتخلص من الأجسام الدهنية الصفراء.

٣ ـ توضع في أنبوبة اختبار تحتوي على مثبت كارنوي حديث التحضير، وتترك لمدة ساعة إلى ساعتين (نصف ساعة قد تكون كافية).

٤ ـ تنقل ٣ إلى ٤ من حويصلات الخصية (Testis follicles) إلى زجاجة ساعة بها قليل من مثبت كارنوى بملقط رفيع وابرة تشريح حادة. يزال الجزء الخلفي من كل حويصلة نظرا لأن هذا الجزء يحتوي على الحيوانات المنوية الناضجة التي قد تؤثر على عملية الهرس.

٥ ـ تنقل الحويصلات القمية (Follicle tips) بالماصة إلى وسط شريحة مجهرية نظيفة ثم توضع قطرة من صبغة خلات الأورسين، وتترك لتأخذ الصبغة مدة ١٥ دقيقة لكن لا يسمح للصبغة بأن تجف إطلاقا.

٦ ـ تمرر الشريحة بسرعة على الموقد الكحولي لعدة مرات مع مراعاة عدم غليان محلول الصبغة. عملية التسخين اللطيفة هذه تساعد على صبغ كروموسومات الخلية بشكل أفضل.

٧ ـ تجفف الصبغة بورقة ترشيح ثم تضاف قطرة من محلول ٤٥٪ حمض خليك.

٨ ـ يترك غطاء الشريحة يسقط مباشرة على الحويصلة ولا تستخدم هذه المرة إبرة التشريح لأن عملية إنزال غطاء الشريحة برفق يسبب خروج عدد كبير من الخلايا مع السائل الخارج حول حواف الغطاء.

٩ ـ يدق بلطف على غطاء الشريحة عدة مرات بإبرة التشريح حتى تنتشر خلايا الحويصلة عن بعضها البعض.

١٠ ـ توضع الشريحة في منتصف ورقة ترشيح مثنية إلى النصف بشرط أن يكون غطاء الشريحة إلى أعلى، ثم يضغط في بادىء الأمر بشكل لطيف، بعدها يضغط جيدا على غطاء الشريحة حتى تنبسط الخلايا جيدا. إذا كان الجو حارا فيفضل أن تدهن حواف

غطاء الشريحة من الخارج بالبرافين أو الفازلين لكي يحد عملية التبخر السريع .
١١ ـ عند الرغبة في عمل شريحة مستديمة خصوصا إذا كان التحضير جيدا، توضع الشريحة وغطاؤها إلى أعلى على سطح من الثلج الجاف وتترك لمدة ٣ إلى ٤ دقائق حتى يتجمد المحلول الخلوي وتلتصق الخلايا على سطح الشريحة بعدها ينزع بسرعة غطاء الشريحة بمساعدة شفرة الحلاقة أو إبرة التشريح ، لكن يجب معرفة أن بعض الخلايا ربما تنفصل مع غطاء الشريحة.
١٢ ـ توضع الشريحة في محلول ٩٥٪ كحول أثيلي لمدة دقيقة إلى دقيقتين، ثم توضع قطرة من محلول الإيوبارال قبل وضع غطاء الشريحة الجديد، وتترك العينة تجف تماما على مجفف الشرائح .
١٣ ـ إذا كان صبغ الخلايا خفيفا فبالإمكان زيادة شدة الصبغ وذلك بإمرار الشريحة من ٩٥٪ كحول اثيلي إلى ٧٠٪ كحول اثيلي، ثم تنقل إلى ٤٥٪ حمض خليك قبل عملية صبغ الخلايا ثانية. وبعدها توضع بضع قطرات من صبغة خلات الأورسين على الشريحة، وتترك لمدة ١٥ دقيقة. تجفف الصبغة بورق ترشيح ثم تمرر الشريحة على ٤٥٪ حمض خليك ثم على ٧٠٪ كحول و٩٥٪ كحول. توضع قطرة من محلول الايوبارال وأخيرا يوضع غطاء الشريحة النظيف وتترك الشريحة لتجف تماما قبل عملية الفحص بالمجهر.

تحضير الكروموسومات البوليتنية في الحيوان

تحتوي خلايا الغدد اللعابية (Salivary gland cells) في العديد من يرقات الحشرات ثنائية الأجنحة (*Dipteran larvae*) ، مثل يرقة حشرة الكيرونومس (Chironomus) ، أو حشرة ذبابة الفاكهة (Drosophila) ، على كروموسومات تعتبر من أكبر الكروموسومات المعروفة على الإطلاق. أما اكتشاف مثل هذه الكروموسومات أو كروموسومات الغدد اللعابية فينسب إلى العالم بالبياني (Balbiani) ، وذلك في عام ١٨٨١م، إلا أنه لم تدرك أهمية هذه الكروموسومات في النواحي الوراثية إلا مؤخرًا .

ففي عام ١٩٣٠م استطاع كل من بينتر (Painter) وهايتز (Heitz) وباور (Bauer)

أن يثبتوا أن كل كرومـوسـوم من هذه الكروموسومات العملاقة ماهو إلا عبارة عن كروموسومين نظيرين في حالة تلاصق تام. مثل هذه الكروموسومات العملاقة تعرف حاليا باسم الكروموسومات البوليتينية (Polytene chromosomes) وقد يصل طولها في ذبابة الفاكهة في خلايا الغدد اللعابية للطور اليرقي الثالث (3rd instar larva) إلى حوالي ٢٠٠٠ ميكرومتر بعد أن تحضر جيدا بطريقة الهرس، كما أن هذه الكروموسومات تمتاز بطابـع تقليمي شريطي، أي أن الكـروموسوم مقسم إلى العديد من الأشرطة الداكنة (Dark bands) والمتعاقبة مع أشرطة أخرى شفافة (Light bands) جعلت من الممكن عمل خرائط تخطيطية دقيقة لكل كروموسوم. مثل هذه الخرائط مكنت علماء الوراثة من إجـراء العـديد من البحـوث الـدقيقة حول العلاقة بين الجينات (Genes) ممثلة بالشرائط والكروموسوم.

المواد والمعدات

(١) قارورة تحتوي على يرقات ذبابة الفاكهة في مرحلة الانسلاخ الثالث.
(٢) أدوات تشريح كاملة.
(٣) شرائح مجهرية
(٤) أغطية شرائح
(٥) ورق ترشيح
(٦) ثلج جاف
(٧) زجاجة ساعة وطبق بترى
(٨) مجهر تشريح
(٩) مجهر ضوئي مركب
(١٠) صبغة خلات الأورسين
(١١) كحول ٩٥٪
(١٢) إيوبارال
(١٣) محلول رنجر للحشرات.

خطوات العمل

١ ـ توضع اليرقة في منتصف الشريحة المجهرية والتي تحتوي على بضع قطرات من محلول رنجر ثم بإبرة التشريح تمسك اليرقة وذلك بالضغط الجيد على منتصف الجسم.
٢ ـ تفصل رأس اليرقة بإبرة تشريح ثانية، وذلك بالسحب حتى يلاحظ خروج الغدد اللعابية مع منطقة الرأس، تخلص هذه الغدد اللعابية من جسم اليرقة، ويفضل أن تتم هذه العملية تحت مجهر التشريح.

٣ ـ تحت مجهر التشريح، تزال الرأس وأجزاء الفم وتترك الغدد اللعابية في وسط الشريحة.

٤ ـ يجفف محلول رنجر باستخدام ورقة الترشيح، ثم تضاف قطرتان إلى ثلاث قطرات من صبغة خلات الأورسين وتترك الخلايا لمدة عشر دقائق ويفضل أن تغطى الصبغة حتى لا تجف وبخاصة في الأجواء الحارة.

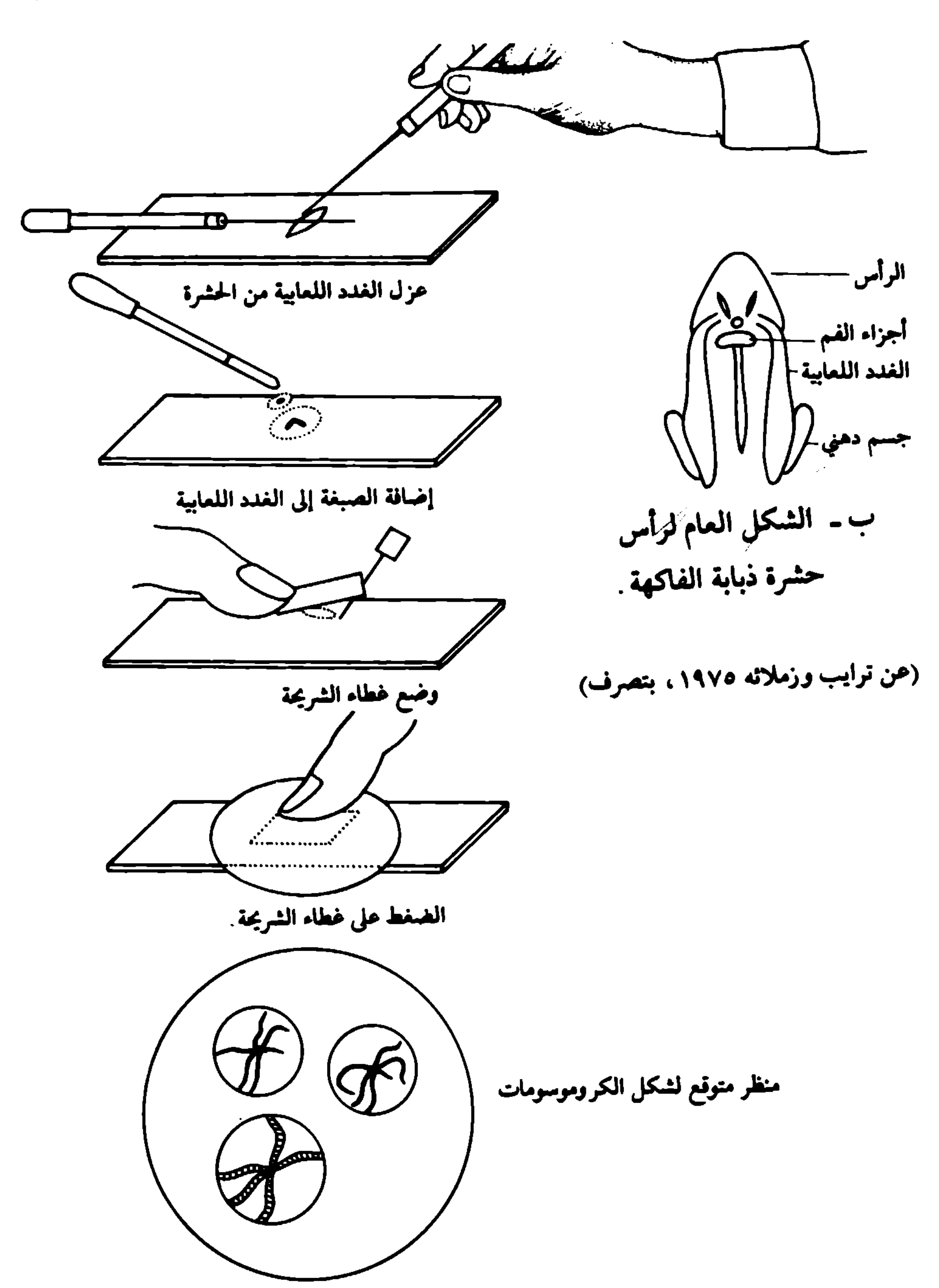
٥ ـ بكل حذر يوضع غطاء الشريحة على الغدد اللعابية وبلطف يدق بنهاية إبرة التشريح على غطاء الشريحة لكي تنتشر الخلايا عن بعضها البعض.

٦ ـ توضع الشريحة في وسط ورقة ترشيح مثنية إلى النصف، ثم بلطف يضغط على ورقة الترشيح حتى تبين معالم غطاء الشريحة وذلك عندما تمتص الورقة قليلا من محلول الصبغة، ثم بإبهام اليد يضغط جيدا على الغطاء مع عدم السماح له بالتحرك إطلاقا. تكرر عملية الضغط مرتين إلى ثلاث مرات حتى تتمدد الكروموسومات البوليتينية جيدا (شكل ٤ ـ ٣).

٧ ـ إذا كان التحضير مرضيا، ويراد عمل شريحة مستديمة فيجب اتباع الخطوات المتبعة في نزع الغطاء كما ذكر سابقا (ص ٧٢).

تحضير أطوار الانقسام غير المباشر في النبات

إن عملية الحصول على الأطوار الانقسامية في الخلايا الجسدية للنبات يعتبر أمرا ميسورا لسهولة الحصول على مثل تلك الخلايا الجسدية الانقسامية في أي وقت. وتعتبر جذور النبات أو القمم النامية من أنسب المناطق لدراسة الانقسام غير المباشر في النبات ولعل نبات البصل (Onion) أو الفول (Beans) بمثابة النباتين النموذجيين لدراسة مثل هذا الانقسام لعدة أسباب من أهمها سهولة زرعها وسرعة نموها وبما تمتاز به من كروموسومات كبيرة في الحجم وقليلة في العدد.



شكل ٤ - ٣: ا - رسم تخطيطي لطريقة تحضير الكروموسومات البوليتينية لذبابة الفاكهة.

المواد والمعدات

(١) جذور نبات البصل أو الفول
(٢) شرائح مجهرية
(٣) أغطية شرائح
(٤) أدوات تشريح كاملة
(٥) ورق ترشيح .
(٦) صبغة خلات الأورسين أو الكرمين
(٧) موقد كحولي
(٨) حمض الهيدروكلوريك (واحد جزيئي)
(٩) مثبت كارنوى.

خطوات العمل

١ ـ يقطع حوالي ١ ـ ٢ سم من جذور النبات لكن يجب أن تؤخذ قمم الجذور (Root-tips) الجيدة، تثبت في الحال في مثبت كارنوى لمدة لا تقل عن خمس دقائق ولا تزيد عن ٢٤ ساعة.

٢ ـ توضع قمة الجذر على الشريحة المجهرية، ثم يقطع خلف قمة الجذر بحوالي ٢ مم، ويستبعد الجزء الذي لا يحتوى على القمة الجذرية خارج الشريحة.

٣ ـ توضع بضع قطرات من حمض الهيدروكلوريك على قمة الجذور ويسخن بلطف على الموقد الكحولي.

٤ ـ تكرر الخطوة رقم (٣) من مرتين إلى ثلاث مرات.

٥ ـ يجفف حمض الهيدروكلوريك بوساطة ورق الترشيح .

٦ ـ توضع قطرتان إلى ثلاث قطرات من صبغة خلات الأورسين على القمة الجذرية وتترك الخلايا تصطبغ لمدة خمس إلى عشر دقائق لكن يجب تغطية الصبغة بزجاجة ساعة أو طبق حتى لا تجف بسرعة.

٧ ـ يُهرس الجذر بنهاية إبرة التشريح حتى تتفكك الخلايا جيدا. تزال الأجزاء الكبيرة بمساعدة الملقط وابرة التشريح ثم يوضع غطاء الشريحة ولكن بحذر.

٨ ـ توضع الشريحة والغطاء إلى أعلى داخل ورقة ترشيح مثنية إلى النصف وبوساطة إبهام اليد يضغط جيدا على الغطاء حتى تنفرد الخلايا بشكل مرض. إذا كان الجو حارا نسبيا فيفضل دهن حواف الغطاء بأية مادة عازلة للتبخر.

٩ ـ إذا كان التحضير مرضيا، فيستحسن تتبع الخطوات الضرورية لعمليات نزع غطاء الشريحة سابقة الذكر عند الرغبة في الحصول على شريحة مستديمة.

تحضير أطوار الانقسام الاختزالي في النبات

يعتبر النبات من أحسن المصادر لدراسة الانقسام الاختزالي بأطواره المختلفة لما تمتاز به الكثير من الخلايا النباتية من كروموسومات كبيرة وقليلة في العدد حتى يسهل على الدارس تتبع وفهم جميع التطورات التي تحدث أثناء الانقسام. وكما هو معروف أن الانقسام الاختزالي لا يحدث إلا في أعضاء خاصة وهي ما تعرف بأعضاء التذكير أو التأنيث. ولعل المتك (Anther) الموجود في زهرة النبات يعتبر الجزء المناسب لدراسة الانقسام الاختزالي بأطواره المختلفة.

المواد والمعدات

(١) براعم زهرية غير متفتحة ومثبتة في مثبت كارنوى
(٢) شرائح مجهرية
(٣) أغطية شرائح
(٤) أدوات تشريح كاملة
(٥) ورق ترشيح
(٦) موقد كحولي
(٧) كحول ٩٥٪
(٨) ثلج جاف
(٩) مجهر ضوئى
(١٠) حمض هيدروكلوريك (واحد جزيئي)
(١١) طبق صغير
(١٢) صبغة خلات الأورسين.

خطوات العمل

١ ـ يفتح البرعم الزهري بمساعدة الملقط وإبرة التشريح ويعزل المتك.

٢ ـ يوضع المتك في منتصف شريحة نظيفة، ثم يضاف بضع قطرات من حمض الهيدروكلوريك وتسخن الشريحة على الموقد الكحولي وبشرط ألا يغلى المحلول. تكرر عملية التسخين من مرتين إلى ثلاث مرات.

٣ ـ يجفف الحمض من على الشريحة ثم يوضع قليل من صبغة خلات الأورسين على المتك وبوساطة نهاية إبرة التشريح يسحق المتك جيدا وذلك بالدق اللطيف ولعدة مرات.

٤ ـ تترك خلايا المتك لتصطبغ في حدود عشر دقائق، إذا كان الجو حارا فيفضل أن تغطى الصبغة بطبق صغير حتى يحد من سرعة التبخر.

٥ ـ تزال جميع الأجزاء الكبيرة والممكن ملاحظتها بالعين المجردة بالملقط وبإبرة التشريح، ثم يوضع غطاء الشريحة على المحلول الخلوي لكن مع عدم السماح بتكون أية فقاعات هوائية.

٦ ـ توضع الشريحة والغطاء إلى أعلى في منتصف ورقة ترشيح مثنية إلى النصف ثم يضغط على هذه الورقة حتى تتبين معالم الغطاء نظرا لامتصاص الورقة لقليل من سائل الصبغة. يضغط بإبهام اليد وبشكل جيد على غطاء الشريحة حتى تنفرد الخلايا تماما. إذا كان الجو حارا فيفضل أن تدهن حواف غطاء الشريحة بقليل من الفازلين حتى لا يتبخر محلول الصبغة بشكل سريع.

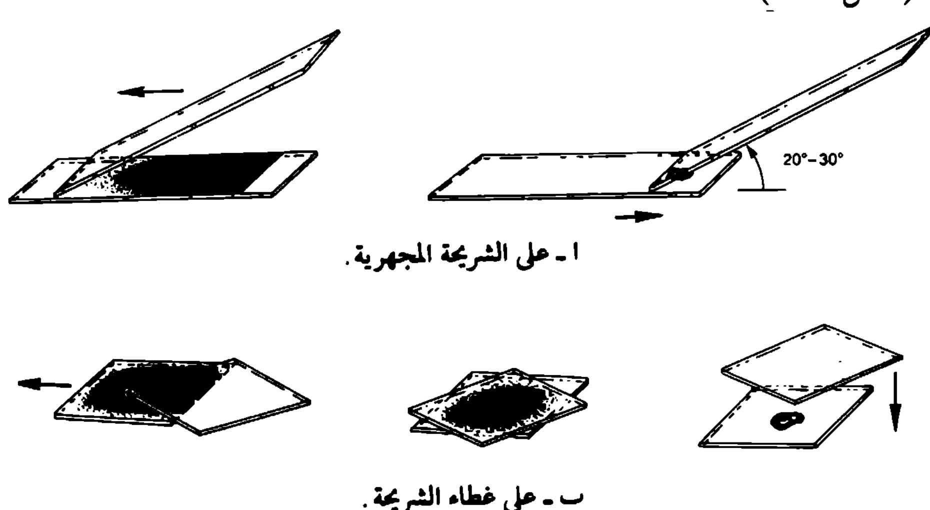
٧ ـ إذا كان التحضير جيدا ويناسب عمل شريحة مستديمة فينزع غطاء الشريحة حسب الخطوات المتبعة سابقا.

طريقة السحب Smearing Method

تعتبر طريقة السحب من أسرع وأنسب الطرق التحضيرية الخاصة بالأنسجة الرخوة مثل الخصى الحيوانية (Animal testes)، والسوائل الحيوية (Biological fluids) مثل الدم (Blood). تعتمد هذه الطريقة على سحب النسيج الخلوي أو كمية قليلة من السائل الخلوي مباشرة على الشريحة المجهرية. تتم الطريقة بوضع قطعة صغيرة من النسيج الخلوي أو قطرة صغيرة من المحلول الخلوي عند أحد أطراف الشريحة المجهرية النظيفة، ثم تسحب العينة الحيوية بشريحة مجهرية أخرى توضع بزاوية ٤٥° على الشريحة الأولى، وبحيث تسحب بسرعة معتدلة إلى الطرف الثاني للشريحة المجهرية الأولى. زاوية الميل ضرورية في التحكم في سمك السحبة الخلوية إذ كلما زادت زاوية الميل كلما قل سمك الفلم الخلوي المسحوب والعكس صحيح. يفضل أيضا أن تكون

حافة شريحة السحب ملساء حتى تتكون طبقة متجانسة السمك من السحبة، لكن يجب أن تجفف السحبة الخلوية بسرعة وذلك بتحريك الشريحة في الهواء لعدة مرات قبل إعدادها للصبغ.

يمكن عمل هذه الطريقة وبالذات مع السوائل الحيوية، بوضع قطرة من المحلول الخلوي في وسط الشريحة ثم تغطية هذه القطرة بشريحة ثانية، لكن بشرط أن تكون مع الأولى حرف (T). تترك الشريحة حتى تنتشر قطرة المحلول الخلوي تماما، بعدها تسحب الشريحة العليا بسرعة ثم يجفف الفلم الخلوي وذلك بتحريك الشريحة في الهواء عدة مرات ثم تصبغ بأية صبغة مناسبة. وبالإمكان عمل مثل تلك السحبة الخلوية بين غطائين وذلك بوضع قطرة من المحلول الخلوي على غطاء شريحة نظيف ويفضل أن يمسك هذا الغطاء فيما بين الابهام والسبابة. يوضع غطاء شريحة آخر نظيف على قطرة المحلول الخلوي بشرط أن يكون هذان الغطاءان ما يشبه النجمة الثمانية الأضلاع. ينتظر قليلا حتى ينتشر المحلول الخلوي تماما، ومن ثم يسحب الغطاء العلوي بشكل ثابت ومنتظم، ويجفف كل من الغطائين في الهواء حيث بعدها يكونان جاهزان للصبغ (شكل ٤ - ٤).



ا - على الشريحة المجهرية.

ب - على غطاء الشريحة.

شكل ٤ - ٤ : طريقة السحب لمحلول الدم. (عن هيوماسون ١٩٧٢)

تحضير سحبة من دم الانسان

الدم عبارة عن محلول خلوي هام ذو لون أحمر نظرا لاحتواء أحد مكوناته (خلايا الدم الحمراء) على مادة ذات لون أحمر ألا وهي مادة الهيموجلوبين (Haemoglobin). يعتبر الدم من السوائل الحيوية، ويوجد في جميع الفقاريات وكثير من الحيوانات اللافقارية. يتكون دم الانسان أساسا من أربعة أنماط مختلفة، سائل البلازما (Blood plasma)، وهو محلول يميل إلى الصفرة وكميته تتراوح فيها بين ٥ ـ ٦ لترات، وهذه الكمية تشكل حوالي ٩٪ من وزن الجسم، كما تسبح فيه خلايا الدم البيضاء (White blood cells)، وخلايا الدم الحمراء (Red blood cells)، والصفائح الدموية (Blood platelets). خلايا الدم البيضاء أو الخلايا عديمة اللون (Luecocytes) حوالي ٧٠٠٠ خلية لكل مليلتر واحد من الدم وتمتاز الخلية الدموية البيضاء باحتوائها على نواة خلوية. يوجد خمس أنواع مختلفة من كرات الدم البيضاء، الخلايا وحيدة النواة (Monocytes) وتعتبر أكبر خلايا الدم البيضاء وتمتاز بنواتها الكلوية الشكل. أما الخلايا اللمفية (Lymphocytes) فتمتاز بأنها خلايا صغيرة لكن أنويتها كبيرة وتحتل معظم حجم الخلية. كما أن هناك الخلايا الحمضية التفاعل (Eosinophils) وهذه تمتاز بأنها تتفاعل جيدا مع الأصباغ الحمضية (Acid dyes) وبها أنوية ذات فصين.

وهناك الخلايا القاعدية التفاعل (Basophils)، وهذه تصطبغ جيدا بالأصباغ القاعدية (Basic dyes)، وتمتاز بأنوية تبدو على هيئة حرف (S). كما يوجد نوع خاص من الخلايا الدموية البيضاء يعرف باسم الخلايا المتعادلة (Neutrophils)، تمتاز بأنويتها المفصصة، حيث تكون النواة مجزأة إلى ٣ ـ ٥ فصوص، وتصطبغ هذه الخلايا جيدا بالأصباغ المتعادلة (Neutral dyes).

أما خلايا الدم الحمراء أو الخلايا الدموية الملونة (Erythrocytes) فتمتاز بلونها الأحمر وعدم احتوائها على أنوية خلوية ويحتوي المليلتر الواحد من الدم على حوالي ٥ ملايين خلية لدى الذكر و٤,٥ مليون خلية لدى الأنثى. تشبه الخلية الدموية الحمراء من حيث الشكل العدسة المقعرة الوجهين ويبلغ متوسط قطرها حوالي ٧ ميكروميتر.

الصفائح الدموية عبارة عن أجسام صغيرة مغزلية الشكل ويبلغ عددها حوالي ٢٠٠,٠٠٠ صفيحة لكل مليلتر واحد من الدم.

المواد والمعدات

(١) شرائح مجهرية
(٢) أغطية شرائح
(٣) كحول اثيلي ٧٥٪
(٤) دبابيس
(٥) صبغة لشهان
(٦) ماء مقطر
(٧) مجهر ضوئي
(٨) كحول مطلق
(٩) زيلول
(١٠) قطن طبي
(١١) طبق صغير
(١٢) بلسم كندا
(١٣) مجفف شرائح

خطوات العمل

١ ـ يعقم إبهام اليد اليسرى بقطعة مبللة بكحول اثيلي ٧٥٪.
٢ ـ يضغط بسبابة اليد اليسرى على وسط إبهام هذه اليد حتى يتجمع الدم في قمة الإبهام.
٣ ـ تثقب قمة الإبهام بدبوس حاد ومعقم بالكحول ويسمح لقطرة من الدم بالسقوط على مقربة من طرف شريحة مجهرية نظيفة جدا.
٤ ـ تسحب هذه القطرة الدموية بشريحة مجهرية أخرى توضع بزاوية ٤٥° على قطرة الدم، لكن يجب أن ينتظر قليلا حتى تنتشر قطرة الدم على حافة شريحة السحب حيث بعدها تسحب هذه القطرة وبسرعة معتدلة إلى الطرف الثاني من الشريحة ليتكون فلما دمويا رقيقا (شكل ٤ ـ ٤).
٥ ـ تجفف الشريحة جيدا بسرعة وذلك بتحريكها في الهواء عدة مرات.
٦ ـ يصبغ الفلم الدموى وذلك بوضع بضع قطرات من صبغة لشهان (Leishmann stain) على الشريحة المجهرية ولمدة خمس دقائق، بعدها تخفف الصبغة وذلك بإضافة كمية من الماء المقطر تعادل كمية الصبغة الموجودة على الشريحة وتحرك

بلطف ويترك الفلم الـدمـوي يصـطبغ لمدة خمس دقائق أخرى يفضل عدم السماح للصبغة بالجفاف وذلك بتغطية الشريحة بطبق صغير أثناء عملية الصبغ .

٧ ـ يغسل الفلم الدموى جيدا لكن بلطف بتيار من الماء الجارى حتى تزول آثار الصبغة الزائدة لأن تيار الماء إذا كان قويا قد يؤدى إلى انسلاخ الفلم الدموى من على الشريحة .

٨ ـ تمرر الشريحة على ٧٥٪ كحول لمدة من دقيقة إلى دقيقتين، ثم على الكحول المطلق قبل غمسها في محلول الزيلول لمدة دقيقة واحدة .

٩ ـ توضع قطرة صغيرة من محلول بلسم كندا في وسط الشريحة، ثم يوضع غطاء الشريحة على هذه القطرة مع عدم السماح لتكون أي فقاعات هوائية بين الشريحة والغطاء على الإطلاق.

١٠ ـ تترك الشريحة لتجف تماما على مجفف الشرائح الذي تكون درجة حرارته حوالي ٤٥°م ولمـدة يوم كامـل على الأقل بعد التأكد من كتابة جميع البيانات اللازمة للتعرف على الشريحة المحضرة، بعدها تكون جاهزة للفحص بالمجهر الضوئي .

طريقة التقطيع Sectioning Method

عملية تقطيع الأنسجة الحيوية إلى قطاعات (Sections) رقيقة جدا بأجهزة خاصة للقطع تعرف باسم الميكروتومات (Microtomes) عملية تحتاج إلى بذل كثير من الجهد والوقت، لكنها تعطي نتائج طيبة وبالذات عند دراسة العينة على مستواها النسيجي . وكما هو معروف أنه عند فحص أي عينة تحت المجهر الضوئي لابد أن تكون شفافة حتى يتمكن الضوء من المرور خلالها، لهذا أصبح من الواجب الحصول على شرائح رقيقـة من العينة يتراوح سمكها عادة فيما بين ٥ إلى ٧ ميكرومترا وهنا سوف نكتفي بتوضيح عمل القطاعات البرافينية (Paraffin sections) والتي يمكن تلخيص خطوات العمل فيها كالآتي :

● **الإعداد لعمل القطاعات في العينة**

تتلخص خطوات عمل القطاعات في التالي :

(١) قتل الحيوان والحصول على العينة.
(٢) تثبيت العينة.
(٣) غسل العينة.
(٤) نزع الماء من العينة.
(٥) ترويق العينة.
(٦) تخليل العينة.
(٧) طمر العينة.
(٨) تقطيع العينة.
(٩) تحميل القطاعات.

● **الإعداد لصبغ القطاعات**
(١) عملية الصبغ.
(٢) عمل الشريحة المستديمة.

أولا: الإعداد لعمل القطاعات في العينة

١ ـ قتل الحيوان والحصول على العينة:

تتم عملية القتل بعدة طرق من أهمها ما يلي:

(ا) الذبح، (ب) التخنيع، (جـ) ضرب مؤخرة الرأس، (د) التخدير.
ولقد سبق الكتابة عن هذه الطرق (انظر ص ٦٠).

٢ ـ تثبيت العينة

لقد كتب بإسهاب عن المثبتات في الباب الثالث (ص٢٤١) لكن يجب معرفة أن اختيار المثبت المناسب لنسيج ما أمر ضروري حيث أن المثبتات المختلفة تتباين كثيرمن حيث تفاعلها مع الأنسجة المختلفة. لذا يعتبر من أهم المواضيع أن يحدد الدارس نوع المثبت المناسب قبل الشروع في العمل وهذا بالطبع يعتمد أساسا على طبيعة الخبرة العملية وإلمام الشخص بعمليات التحضير. إذا حدث أن فشلت طريقة تحضيرية عامة

فيجب التأكد من أن سبب الفشل ليس ناتجا عن نقص في الخبرة قبل محاولة استخدام طريقة تحضيرية جديدة.

وكما هو معروف فإن الأنسجة الخلوية تتحلل بسرعة بعد قتل الحيوان وذلك بفعل البكتريا التي تعمل على إتلاف الخلايا وكذلك لوجود بعض الإنزيمات المحللة في الخلايا ذاتها. لهذا نلجأ الى القيام بعملية تثبيت العينة في المثبت المناسب. لكن يجب معرفة أن المثبتات المائية (Aqueous fixatives) تذيب مادة النشا الحيواني (Glycogen) أما المثبتات الكحولية فهي تذيب المواد الدهنية (Lipids) كما يجب الأخذ بعين الاعتبار أن العلاقة بين حجم العينة وسرعة نفاذية المثبت أمر بالغ الأهمية، فكلما قلت سرعة النفاذية تحتم تصغير حجم العينة، وبشكل عام كلما صغر حجم العينة المثبتة كلما كانت عملية التثبت أنسب وأدق. ويفضل أن تكون كمية محلول المثبت أكبر بحوالي عشر مرات من حجم العينة المثبتة. كما يستحسن أن توضع العينة في المثبت مباشرة فور الحصول عليها من الكائن. ويفضل ألا يزيد قطر العينة عن ٢ سم. وفي حالة الأنسجة الهشة يستحسن وضع القطع الكبيرة في محلول المثبت لمدة ١٥ دقيقة قبل عملية تجزئتها إلى قطع صغيرة. يجب استخدام شفرات حلاقة حادة جدا وجديدة، وهذا يضمن عدم اتلاف الأنسجة التي يمكن أن يحدث فيما لو استخدم المقص. كما يجب عدم السماح للعينة بالجفاف إطلاقا من أثار المثبت ويفضل رج محلول المثبت بلطف بعد وضع العينة لعدة مرات حتى تتبلل جميع أسطح العينة. أما الوقت المناسب للتثبيت فيعتمد على نوع المثبت وطبيعة العينة والغرض المطلوب.

٣ ـ غسل العينة

بعد إتمام عملية التثبيت يتحتم التخلص من آثار المثبت المتبقية في العينة والتي قد تؤثر على خطوات التحضير اللاحقة. غالباً، عملية الغسل تتم باستخدام الماء الجاري لكنها في الحقيقة تتوقف على نوعية المثبت المستخدم. العينات المثبتة في مثبت بوان (Bouin fixative) يجب غسلها في ٧٠٪ كحول حتى يزول اللون الأصفر من محلول الغسيل والناتج عن حمض البكريك (Picric acid)، أما العينات المثبتة في مثبت يحتوي

كلوريد الزئبق مثل مثبت زنكر (Zenker fixative) فيجب غسلها في ٩٦٪ كحول مضافا إليه كمية من اليود (محلول كحولي مشبع باليود) يجب أن يكون لونه بني غامق ويعرف باسم الكحول اليودي (Iodine-alcohol) وتتراوح مدة الغسل بين ٥ ـ ٨ ساعات ويجب إضافة كمية من الكحول اليودي كلما زال اللون. ووظيفة اليود هي إزالة كلوريد الزئبق من العينة وذلك للتخلص من مشكلة ترسبات سوداء تحدث بعد صبغ القطاعات يسببها كلوريد الزئبق. العينات المثبتة في مثبت روسمان (Rossman) والذي لا يدخل الماء في تركيبه تغسل في ٩٦٪ كحول، أما العينات المثبتة في الفورمالين (Formalin) فعادة تغسل بماء الصنبور الجاري لمدة ٢٤ ساعة على الأقل حتى يتم التخلص من آثار هذا المثبت، ومن المعلوم أنه بعد عملية غسل العينة بالإمكان حفظها في ٧٠٪ كحول اثيلي إلا أنه يفضل القيام بعملية نزع الماء وطمر العينة في شمع البرافين.

٤ ـ نزع الماء من العينة

من المعروف أن الماء لا يمتزج مع مادة شمع البرافين شائعة الاستعمال في عمليات الطمر، لذا فمن الضروري التخلص من الماء الموجود في النسيج الخلوي حتى تسهل عملية نفاذ البرافين المصهور الى داخل الأنسجة. وتتم عملية نزع الماء عادة بتمرير العينة على سلسلة متدرجة الارتفاع في التراكيز من محاليل الكحول الاثيلي. ويفضل استخدام الكحول الاثيلي كمادة نازعة للماء لأنه يمتزج بسهولة مع الماء ومع مادة الزيلول المروقة والتي بدورها تمتزج جيدا مع مادة الطمر البرافينية.

تتراوح المدة اللازمة لترك العينة في كل خطوة من خطوات نزع الماء في محاليل الكحول المختلفة التراكيز فيما بين ثلاثين دقيقة إلى ثلاث ساعات كحد أقصى ويرجع هذا التفاوت في الزمن إلى الحجم ونوع العينة المستخدمة. كما يفضل أن تمرر العينة في مراحلها الأخيرة من خطوات نزع الماء على محلولين منفصلين من الكحول المطلق ولمدة ٢ ـ ٣ ساعات في كل مرة. الهدف المقصود من تمرير العينة على المحلول الكحولي المطلق الثاني هو لزيادة التأكد من تمام نزع الماء من العينة، ويجب عدم ترك العينة لمدة

طويلة في الكحول المطلق لما يسببه من صلابة للنسيج وبالتالي صعوبة في عملية القطع.

كما يمكن نزع الماء من العينة بتمريرها في محاليل أخرى بدلا من الكحول الأثيلي مثل الديوكسان (Dioxane) والبيوتانول (Butanol) وكذلك الأيزوبروبانول (Isopropanol). في الحقيقة يعتبر كحول الأيزوبروبانول معادلا للكحول الأثيلي في الجودة ككحول نازع للماء، ويمتاز بأنه لا يسبب أي انكماش أو صلابة للأنسجة الخلوية فيما لو قورن بالكحول الأثيلي، ولعل من أهم عيوب كحول الايزوبروبانول عدم صلاحيته مع العينات المراد طمرها في مادة النتروسيليلوز (Nitrocellulose) نظرا لعدم ذوبان هذه المادة فيه كما أن معظم الأصباغ المعروفة لا تذوب فيه أيضا.

عند القيام بعملية تحضير سلسلة الكحول متدرجة التراكيز يفضل استخدام ٩٥٪ كحول أثيلي بدلا من الكحول المطلق، ومنه تعمل التراكيز المطلوبة. فلكي نحضر محلول بتركيز ٧٠٪ نأخذ ٧٠ مل من محلول الكحول ٩٥٪ ونضيف إليه ٢٥ مل من الماء المقطر فنحصل على ٩٥٪ مل كتركيز نهائي. في الحقيقة، لا يوجد كحول مطلق تماما (١٠٠٪) لكن في الغالب يحتوي على نسبة ١ إلى ٢٪، من الماء ولذا يعتبر بمثابة محلول مطلق بشرط أن لا تزيد نسبة الماء عن ٢٪. للتأكد من زيادة نسبة الماء عن ٢٪ يضاف ٥ مل من المحلول الكحولي إلى ٥ مل من الزيلول أو التولوين (Toluene) فإذا لم يتعكر لون المزيج يعتبر الكحول مطلقا.

٥ ـ ترويق العينة

من المعروف أن الكحولات المستخدمة في عمليات نزع الماء من أنسجة العينة لا تمتزج مع شمع البرافين، لذا يجب التخلص من جميع آثارها في العينة، وذلك بغسل العينة بمادة تمتزج مع الكحول ومادة الطمر البرافينية. عندما تحل هذه المادة المروقة بدلا من الكحول تسهل عملية نفاذ شمع البرافين الى العينة ولهذا يعتبر محلول الزيلول (Xylol) من أنسب المحاليل المروقة لسهولة أمتزاجه مع البرافين والكحول على حد سواء.

ورغم أن الزيلول يعتبر من أكثر المحاليل شيوعا كمادة مروقة إلا أن هناك مواد هيدروكربونية أخرى يمكن استخدامها كمروقات مثل التولوين (Toluene) والبنزين (Benzene) والكلوروفـورم (Chloroform) وزيت الخشب ولكنها مواد سريعة التطاير وغالية الثمن.

عند استخدام الزيلول والتولوين أثناء عملية الترويق يحدث أحيانا أن يتعكر (cloudy) لون محلول مادة الـترويق وهذا دليل كاف على عدم اكتمال نزع الماء من أنسجـة العينة. في هذه الحالة يجب إرجاع العينة إلى سلسلة الكحولات للتأكد من عملية نزع الماء بشكل تام.

أمـا المدة الكافية لترك العينة في المحلول المروق، فهذا يعتمد على نوع وحجم العينة فكلما زاد حجم العينة كلما زادت مدة الترويق.

٦ ـ تخليل العينة

قبل أن تطمر العينة في شمع البرافين المنصهر مثلا، يجب إعدادها مسبقا وذلك بتخليل العينة بالبرافين، وبمعنى آخر، يجب أن تشبع العينة بالبرافين. وتتم عملية التخليل بتمرير العينة على مزيج متساو من الزيلول والبرافين، ثم تنقل العينة في شمع البرافين المنصهر داخل الفرن. وتكرر هذه العملية لعدة مرات (٢ ـ ٥) كل مرة لمدة نصف ساعة. كما تعتمد عدد مرات تغيير الشمع حسب نوع العينة بحيث تقل كلما كانت العينـة رخـوة وتـزداد كلما كانت العينة صلبة. الجدير بالذكر أن شمع برافين التخليل يجب أن يكون تام الانصهار، فلقد وجد أن شمع البرافين المنصهر والمحفوظ لمدة أسبـوع في فرن ساخن درجة حرارته أعلى قليلا من درجة انصهار الشمع يمتاز بسرعة نفاذ أسرع من حديث التحضير.

٧ ـ طمر العينة

عادة يوجـد نوعان من شمع البرافين، رخو (Soft) تتراوح درجة انصهاره فيما بين

٥٠ و٥٢°م، وشمع برافين صلب (Hard) درجة انصهاره تتراوح فيها بين ٥٦ و٥٨°م. ولقد أثبتت التجارب المعملية أن الشمع الرخو يستخدم مع العينات اللينة والشمع الصلب يستخدم في الأجواء الحارة ومع العينات الصلبة.

ويستخدم لعملية الطمر صندوق مربع أو مستطيل مفتوح الجهتين أو قالب مكون من قضيبين من المعدن كل منهما على شكل حرف (L)، وهذا يسهل عملية التحكم في حجم صندوق الطمر. كما يمكن استخدام علبة الكبريت الفارغة أو عمل مثل هذا القالب من الورق المقوى أو من ورق القصدير الرقيق. قبل عملية الطمر، يفضل أن تدهن حواف القالب الداخلية بمادة الجلسرين حتى لا يلتصق شمع البرافين بحوافه. أما عملية الطمر، فتتم بوضع قالب الطمر على لوح زجاجي رقيق ثم يسكب شمع البرافين المنصهر في هذا القالب وتوضع العينة مباشرة بملقط دافيء وسط الشمع المنصهر. تحرك العينة قليلا بإبرة تشريح ساخنة حتى نضمن عدم تكون أية فقاعات هوائية وكذلك توجه العينة حسب الرغبة. عندما تتكون طبقة متجمدة على سطح القالب وذلك بعد النفخ المستمر على السطح العلوي للبرافين المنصهر، يغمر القالب في ماء بارد (١٠ ـ ١٥°م) حتى تتم عملية تصلب البرافين.

٨ ـ تقطيع العينة

قبل إلصاق العينة في جهاز القطع يستحسن تشذيب (Triming) قالب البرافين بشفرة حادة حتى تصبح العينة في وضع مناسب للتقطيع. تثبت العينة جيدا على حامل العينة (Specimen's holder) في الميكروتوم، كما يجب أن يزود جهاز القطع بسكين حادة جدا ويحدد سمك القطاع المرغوب فيه (٥ ـ ٧ ميكرومیتر). القطاعات الجيدة تكون عادة على شكل سلسلة متصلة من القطاعات ويفضل أن توضع هذه الأشرطة (Ribbons) على صفيحة سوداء حتى يسهل تمييز القطاعات وأخذ المناسب منها لوضعه على الشريحة المجهرية.

وهناك العديد من الصعوبات التي تواجه عملية القطع والتي بالإمكان إدراجها في الجدول (٤ ـ ١) مع بعض الاقتراحات المناسبة للحل.

جدول (٤ ـ ١) أهم المشكلات ومسبباتها والتي قد تعوق عمليات القطع وكيفية تفاديها

المشكلة	الأسباب	الحلول
شريط القطاعات تتقوس	● حواف القالب غير متساوية ● الحد القاطع للسكين غير جيد ● أحد حواف القالب أدق من الآخر.	● يجب تسوية الحواف ● يجرب جزء آخر من السكين. ● يترك القالب ليبرد ويعالج سبب اختلاف درجة الحرارة.
القطاعات مضغوطة	● السكين غير حادة ● الشمع المستعمل للطمرلين.	● يجرب جزء آخر من السكين ● يستبدل الشمع بنوع آخر أكثر صلابة، ويزاد سمك القطاع.
القطاعات غير متساوية الأبعاد	● درجة حرارة القالب مرتفعة ● القالب أو حاملة غير مثبتين ● السكين غير جيدة الربط وتهتز ● السكين ليست حادة ● هناك عيب بالميكروتوم	● يترك ليبرد ● يثبت القالب وحامله بشكل جيد ● تربط السكين جيدا ● تستبدل بسكين حادة ● يجب اصلاحه.
القطاعات منتفخة في الوسط	● القالب بارد في الوسط دافىء من الجوانب ● جزء من السكين يكون أحد من الأجزاء الأخرى ● المادة المروقة (الزيلول) لا زالت في العينة	● يترك ليبرد ● يجرب منطقة أخرى منها ● يذاب الشمع ثم تطمر العينة في شمع نقي.
العينة داخل القطاعات تسقط أو تنكسر	● العينة لم يتخللها الشمع جيدا أو تحتوي على نسب من الماء.	● يذاب الشمع ثم تعاد عمليات نزع الماء والترويق والتخليل والطمر من جديد.
الشريط ينشق في الوسط	● يوجد ثلم في حافة السكين ● يوجد شوائب صلبة في العينة	● يجرب جزء آخر من السكين ● يجب إبعاد هذه الشوائب قدر الإمكان.
الشريط يرتفع مع القالب	● الشريط متكهرب ويستدل على ذلك بالتصاقه بأية جسم آخر ● الحافة العليا للقالب بها قطعة شمع جافة ● السكين ملتصقة بها قطعة شمع.	● ترفع الرطوبة النسبية في الغرفة ● تزال بالموس ● تنظف الحافة بالزيلول.
القطاعات جيدة لكنها لا تتماسك مع بعضها البعض.	● الشمع المستعمل صلب.	● يغطس القالب في شمع لين.
القطاعات تتقوس	● الشمع المستعمل صلب جدا	● يذاب الشمع وتطمر العينة في شمع لين.
شمع القالب يتفتت	● يوجد به آثار من مادة الترويق (الزيلول).	● يذاب الشمع ثم تطمر العينة في شمع نقي.

* كلمة القالب (Block) يقصد بها العينة وما يحيط بها من مادة الطمر.

٩ ـ تحميل القطاعات

يقصد بعملية تحميل القطاعات، وضع القطاع النسيجي على الشريحة المجهرية، ويمكن أن تتم هذه العملية بإحدى الطريقتين:

ا ـ يوضع القطاع في حمام مائي يحتوي على ماء درجة حرارته ٤٠ ـ ٤٥°م، ويترك القطاع يطفو على سطح الماء لمدة ١ ـ ٢ دقيقة حتى ينفرد تماما.
تمرر الشريحة المجهرية تحت هذا القطاع، ويلتقط بحيث يلتصق على وسط الشريحة وذلك برفع الشريحة باتجاه القطاع إلى أعلى مع عدم السماح لتكون أية فقاعات هوائية بين القطاع والشريحة. تترك الشريحة لتجف على مجفف الشرائح (٤٥°م) لمدة ٢٤ ساعة تقريبا. كما يفضل أن تكون الشريحة المجهرية قد دهنت مسبقا بلاصق ماير (Mayer albumen) وهو عبارة عن حجمين متساويين من مادة زلال البيض والجلسرين ويضاف إليهما قليل من سلسلات الصوديوم (Sodium salicylate) كمادة حافظة.

ب ـ ينقل القطاع مباشرة إلى شريحة مجهرية عليها قطرة من الماء المقطر، ثم توضع هذه الشريحة على مجفف الشرائح (٤٥°م) وتترك حتى تتبخر القطرة المائية ويلتصق القطاع جيدا على الشريحة والمسبق دهنها بلاصق ماير الألبيومينية اللاصقة.
يستخدم لاصق ماير حتى تزيد من نسبة التصاق القطاع على الشريحة مما يضمن عدم سقوط القطاع أثناء عمليات الصبغ.

ثانيا: الإعداد لصبغ القطاعات

١ ـ عملية الصبغ

سيأتي الحديث بشيء من التفصيل في ص٩٩، ص١٩٧ عن أهمية الأصباغ وأنواعها وكيفية تفاعلها مع الأنسجة الخلوية، والآن يجب علينا التعرف على عملية الصبغ ذاتها.

لا شك أن هناك قواعد رئيسية للصبغ، ولو أنها أحيانا تتفاوت وبناء على نوع النسيج والغرض المقصود من الدراسة. فمن المعروف أن جميع القطاعات البرافينية

يجب أن يذاب الشمع منها تماما بالزيلول، نظرا لأن الغالبية من الأصباغ إما أن تكون مائية أو كحولية الذوبان. هذا يعني أن مثل هذه الأصباغ لن تستطيع النفاذ في الأنسجة الخلوية ما دامت محاطة بشمع البرافين. كما يجب التخلص من الزيلول لأنه هو الآخر غير مناسب للأصباغ ويتم التخلص منه بالكحول المطلق. بعد استبدال الزيلول بالكحول يتحتم نقل القطاعات الى بيئة مشابهة للبيئة المذابة فيها الصبغة فإذا كانت الصبغة مذابة في الماء مثلا يجب تميؤ (Hydration) القطاعات وذلك بتمريرها على سلسلة تركيزها متدرج الانخفاض من محاليل الكحول حتى تصل إلى الماء. أما إذا كانت الصبغة مذابة في ٥٠٪ كحول فيكتفى بتمرير القطاعات في السلسلة الكحولية حتى تصل إلى الكحول ٥٠٪، وذلك قبل غمرها في محلول الصبغة. كما يجب تحديد مدة الصبغ المناسب ويعتمد هذا على نوع الصبغة وتركيزها وطبيعة النسيج ويحدد عادة بتكرار التجربة. قد تتطلب الدراسة صبغ النسيج بأكثر من صبغة أو يلجأ الباحث إلى استخدام ما يعرف بالصبغ المضاد (Counter staining) كاستخدام صبغة الهيماتوكسلين (Haematoxylin) لصبغ أنوية الخلايا وصبغة الإيوسين (Eosin) لصبغ مادة السيتوبلازم.

٢ ـ عمل الشريحة المستديمة

بعد الانتهاء من عملية الصبغ تبدأ عملية إعداد الشريحة المجهرية للحفظ المستديم، وذلك باستخدام مادة شمعية أو بلاستيكية حافظة مثل مادة بلسم كندا.

ولما كانت غالبية المواد الحافظة المستخدمة في عمل الشرائح المستديمة لا تذوب في الماء أو الكحول، فإن هذا يعني ضرورة التخلص من الماء والكحول الموجود في القطاعات المصبوغة. للتخلص من الماء الموجود في القطاعات يجب تمريرها على سلسلة متدرجة الارتفاع في التركيز من محاليل الكحول الاثيلي بعدها يتم التخلص من الكحول بتمرير القطاع على محاليل نقية من الزيلول. وبعد التأكد من استبدال الكحول بمحلول الزيلول، يضاف قطرة صغيرة من محلول بلسم كندا المذاب في الزيلول على القطاع مباشرة، ثم يوضع غطاء الشريحة (Cover-slip) وبحذر شديد حتى

لا تتكون أية فقاعات هوائية بين الشريحة والغطاء، وهكذا يتم عمل ما يعرف بالشريحة المستديمة. يستحسن أن تترك الشريحة لمدة ٢٤ ساعة على الأقل على مجفف الشرائح حتى يتم جفاف مادة بلسم كندا تماما بعدها يمكن فحص القطاعات بالمجهر.

الفصل الخامس

أصباغ الأنسجة

● مقدمة ● الأنسجة ● كيمياء الأنسجة
● الحموض النووية ● الإنزيمات
● الدهون ● المواد الكربوهيدراتية
● الكيتين ● السيليلوز ● النشاء
● اللجنين

مقدمة

ستتناول في هذا البحث سردا لبعض من طرق الصبغ العامة، والتي تهدف أساسا إلى توضيح التراكيب الخلوية ولا تعطي معلومات عن كيمياء الأنسجة. وقبل معاملة القطاعات أو العينات بالصبغة المختارة يجب إحضارها إلى الماء كما وصف آنفا.

أصباغ الأنسجة

صبغة مايرهيمالوم (Mayer's haemalum (from Grimstone and Skaer, 1972

هذه الصبغة سريعة ولا يستحب استخدامها في حالة العينات المثبتة بالمثبتات التي تحتوي على رابع أكسيد الأوزميوم، وتحضر هذه الصبغة كما يلي:

أ- هيماتوكسلين Haematoxylin	١ جم
ايودات الصوديوم Sodium Iodate	٠,٢ جم
الشب البوتاسي Potassium alum	٥٠ جم
ماء مقطر Distilled water	١٠٠٠ مل

يرج الخليط جيدا على فترات حتى يصبح السائل بنفسجيا مزرقا ثم يضاف:

هيدرات الكلور Chloral hydrate ٥٠ جم

حمض الليمون Citric acid ١ جم

المحلول سوف يتغير لونه إلى البنفسجي المحمر، وعند هذا الحد ممكن خزن هذا السائل في قارورة ذات جدار زجاجي قوي.

ب ـ إيوسين (Y) (محلول مشبع في ٩٠٪ كحول أثيلي).

طريقة الصبغ

١ ـ تصبغ القطاعات في صبغة الهيمالوم (محلول أ) لمدة ٥ ـ ١٥ دقيقة، وفي هذه الحالة فإن الوقت ليس حرج ويمكن معرفة وقت الصبغة المناسب عندما تبدأ الصبغة بالظهور على القطاعات.

٢ ـ تغسل القطاعات في ماء الحنفية (الصنبور) الجاري حتى يصبح لون القطاعات أزرق.

٣ ـ تنقل القطاعات إلى محلول ٧٠٪ ثم ٩٠٪ كحول اثيلي.

٤ ـ تصبغ في محلول الأيوسين (محلول ب)، من ٢ ـ ٣ دقائق.

٥ ـ تغسل القطاعات في ٩٠٪ كحول إيثلي.

٦ ـ تنقل القطاعات الى كحول إثيلي المطلق، وثم إلى الزيلول لمدة دقيقتين لكل منهما. يوضع الغطاء الزجاجي على الشريحة مستخدما محلول بلسم كندا.

النتيجة: الأنوية تصطبغ باللون الأزرق والسيتوبلازم بلون قرنفلي (Pink).

صبغة الهيماتوكسلين الحديدي **Iron haematocylin (from Grimstone and Skaer, 1972)**

هذه الصبغة جيدة وبالخصوص للقطاعات التي يراد تصويرها فوتوغرافيا، فهي قادرة على توضيح التفاصيل الصغيرة جدا في الخلية أو النسيج ويتم تحضير محاليلها كما يلي:

ا ـ الشب الحديدي Iron alum ٣٪ (في الماء)

(كبريتات الأمونيوم الحديدية Ferric ammonium sulphate)

ب ـ هيماتوكسلين (٥٪ في ٩٠٪ كحول إثيلي) ١ جم

ماء مقطر ٩ حجوم

وبـالنسبة للمحلول (ب) يجب أن يحضر قبل الاستعمال بعدة أسابيع ويترك لإعطاء فرصة لإتمام التأكسد، أو يمكن إضافة ٢ جم من يودات الصوديوم لكل ١ جم من الهيماتوكسلين. ونتيجة لذلك سوف تتم عملية التأكسد خلال ساعات قليلة من تحضير المحلول.

طريقة العمل

١ ـ توضع القطاعات في محلول الشب الحديدي لمدة تتراوح ما بين ٣٠ دقيقة إلى ٢٤ ساعة.

٢ ـ تغمس القطاعات في ماء مقطر.

٣ ـ تصبغ في الهيماتوكسلين الحديدي لمدة تتراوح ما بين ٣٠ دقيقة إلى ٢٤ ساعة ويحبذ دائما استخدام مدة زمنية مشابهة لزمن الخطوة رقم (١).

٤ ـ تجرى عملية المفاضلة في محلول الهيماتوكسلين الحديدي (يستخدم نفس المحلول ٣٪ ويمكن أن يخفف إلى ١,٥٪). وعملية المفاضلة هذه تتم بوضع القطاعات في محلول الهيماتوكسلين الحديدي ثم نقلها إلى ماء الصنبور ومن ثم فحص القطاعات تحت المجهر الضوئي. ويجب تكرار هذه العملية حتى ترى تحت المجهر صورة واضحة لكل من النواة والسيتوبلازم. وتحتاج هذه العملية إلى مران.

٥ ـ تغسل القطاعات لمدة تتراوح ما بين ساعة إلى عدة ساعات في ماء الحنفية (الصنبور).

٦ ـ تجفف القطاعات في سلسلة من تركيزات كحول الأثيلي التصاعدية، وتنقل إلى الزيلول، ومن ثم يوضع غطاء الشريحة الزجاجي.

النتيجة: الأنوية، الكروموسومات وكريات الدم الحمراء جميعها تصطبغ باللون الأسود الغامق، أما التراكيب الأخرى فتظهر في لون يتراوح ما بين الرمادي إلى الأزرق المسود.

صبغة مالوري Mallory stain (after Cason, 1950 in Grimstone and Skaer, 1972)

هذه الصبغة تصبغ الأنسجة بألوان حمراء، وزرقاء، وصفراء زاهية. لكن هذه الألوان الزاهية تبدأ بالأفول (تبهت) في خلال سنة من صبغها. ويستحسن دائما حفظ القطاعات المصبوغة بعيدا عن الضوء. لا تستعمل هذه الصبغة للقطاعات المثبتة بمثبتات تحوي محاليل رابع أكسيد الاوزميوم، وتحضر كما يلي:

حمض الفسفوتنجستيك Phosphotungstic acid	١ جم
مادة الـ Orange G	٢ جم
أزرق الأنلين Aniline blue (W.S.)	١ جم
الفيوشن الحمضي Acid fuchsin	٣ جم
ماء مقطر	٢٠٠ مل

تضاف هذه المواد الأربعة آنفة الذكر إلى الماء المقطر على التوالي وتذاب كل واحدة قبل إضافة المادة التالية لها.

طريقة العمل

١ ـ تمرر القطاعات على سلسلة متدرجة تنازليا لتراكيز مختلفة من الكحول الإثيلي لغرض إرجاع الماء إلى القطاعات.

٢ ـ تحضر القطاعات إلى الماء ومن ثم تنقل إلى محلول الصبغة لمدة خمس دقائق.

٣ ـ تغسل في ماء الصنبور الجاري لمدة ٤ ـ ٦ ثوان.

٤ ـ تمرر القطاعات في سلسلة تراكيز الكحول الإيثلى التصاعدية بسرعة، ثم تروق القطاعات بوضعها في محلول الزيلين، بعدها تغمر في بلسم كندا وتغطى بالغطاء الزجاجي.

النتيجة: الأنوية حمراء، النويات صفراء، مادة الكولاجين والمواد المخاطية زرقاء، كرات الدم الحمراء صفراء والسيتوبلازم قرنفلي إلى أصفر اللون.

صبغة السفرانين والأخضر السريع

Safranin and fast green (in Grimstone and Skaer, 1972)

هذه الصبغة يمكن استخدامها للقطاعات المعمولة باليد وعادة تناسب الأنسجة النباتية. وطريقة تحضيرها كما يلي:

ا - محلول من السفرانين و Safranin O (١٪ في ٩٥٪ كحول إثيلي) ويخفف بحجم مساوٍ له من الماء قبل استخدامه.

ب - حمض الخل الثلجي Acetic acid (glacial) ١ مل
كحول إيثلي ٧٠٪ ١٠٠مل

جـ - الأخضر السريع Fast green ٥, ٠٪ ويذاب في خليط من زيت القرنفل (Clove oil) والكحول المطلق بنسبة ١ : ١.

د - زيت القرنفل Clove oil ٥٠ مل
كحول اثيلي مطلق Absolute ethanol ٢٥ مل
الزيلول Xylene ٢٥ مل

طريقة العمل

١ - تصبغ القطاعات بالسفرانين ولمدة تتراوح ما بين ١ و٢٤ ساعة.
٢ - تغسل في الماء المقطر.
٣ - تغمس القطاعات في الكحول الحمضي (محلول ب)، لمدة ٢٠ إلى ٣٠ ثانية.
٤ - تمرر القطاعات في كحول إثيلي ٩٠٪ ومن ثم كحول إثيلي مطلق لمدة دقيقة لكلاهما.
٥ - تصبغ القطاعات في محلول الأخضر السريع (محلول جـ) لمدة ــــ - ٤ دقائق.
٦ - تنقل القطاعات إلى محلول (د) ولمدة ١٠ - ٣٠ دقيقة.
٧ - تنقل القطاعات إلى محلول زيلول ومن ثم تطمر وتغطى بالغطاء الزجاجي.

النتيجة: الأنوية والكروموسومات والكيوتيكل واللجنين جميعها تصطبغ باللون الأحمر، أما المكونات الأخرى فتصطبغ باللون الأخضر.

صبغة كارمين البوراكس Borax Carmine (in Grismtone and Skaer, 1972)

تستخدم هذه الطريقة لصبغ العينات الكاملة. وهذه الصبغة شفافة وعند تمرير هذه العينات خلال الكحول الحمضي تبقى الصبغة فقط في الأنوية ولكن عند استخدام مثبت الفورمالدهايد حتى الأنوية تصبح صبغتها ضعيفة.

طريقة التحضير

كارمين Carmine	٣ جم
بوراكس Borax	٤ جم
ماء مقطر	١٠٠ مل

تغلى هذه المواد مع بعضها البعض لمدة ٣٠ دقيقة ثم تبرد، ويضاف حجم مساو من ٧٠٪ كحول إثيلي ومن ثم ترشح الصبغة قبل استخدامها.

طريقة العمل

١ ـ توضع العينة أو العينات المثبتة في محلول الصبغة لمدة حوالي ١٠ دقائق.
٢ ـ تنقل العينات إلى الكحول الإثيلي الحمضي (تضاف أربع نقط من محلول حمض الهيدروكلوريك المركز إلى ١٠٠ مل من كحول إثيلي ٧٠٪).
٣ ـ عندما تصبح العينات شفافة، تجفف بتراكيز مختلفة من الكحول، ثم تنقل إلى الزيلول وبعد ذلك تطمر وتغطى.

النتيجة: الأنوية تصطبغ باللون الأحمر الغامق (الأرجواني) بينما السيتوبلازم يظهر بلون أخضر.

أصباغ كيمياء الأنسجة Histochemical Stains

هناك العديد من الأصباغ المشهورة في مجال كيمياء الأنسجة، وسوف نكتفي بذكر أهم الطرق المستخدمة فيها هذه الأصباغ للكشف عن المكونات الكيميائية للنسيج.

١ ـ طريقة أزرق البروموفينول الزئبقي

Mercury-Bromophenol Blue Method (Hg B Pb) (after Bonhag, 1955)

استخدم العالم ديرام (Durrum in Pearse 1968) عام ١٩٥٠، هذه الطريقة للكشف عن بقع البروتين من على أوراق الترشيح، ولكن فيما بعد استخدمها العالم بونهاج (Bonhag) عام ١٩٥٥م ككشف عام عن البروتينات في بعض الأنسجة الحيوانية من عضلات وخلايا بيضية وخلافها. كما حبذ العالم (Pearse) عام ١٩٦٨م استخدامها كصبغة عامة للكشف عن البروتينات، ومن المستحسن تثبيت العينات بمثبتات الكارنوى أو الفورمالين، لكن يجب عدم استخدام مثبتات الأوزميوم.

طريقة تحضير المحلول

هناك طريقتان يمكن استخدامهما لتحضير المحلول، إحداهما عبارة عن ١٪ محلول البروموفينول الكحولي المشبع بكلوريد الزئبق ($HgCl_2$). أما الأخرى فهي ١٪ محلول كلوريد الزئبق ($HgCl_2$) مضاف إليه ٠٫٠٥٪ محلول أزرق البروموفينول في ٢٪ حمض الخل المائي، ويفضل استخدام المحلول الثاني لعمل الكشف.

طريقة العمل

١ ـ تمرر القطاعات على سلسلة متدرجة تنازليا بتراكيز مختلفة من الكحول الاثيلي لغرض إرجاع الماء إليها.

٢ ـ تصبغ القطاعات في إحدى المحلولين آنفي الذكر لمدة ساعتين عند درجة حرارة الغرفة.

٣ ـ تغمس القطاعات لمدة خمس دقائق في ٠٫٥٪ حمض الخل.

٤ ـ تنقل القطاعات مباشرة إلى محلول كحول البيوتيل الثلاثي (Tertiary butyl alcohol).

٥ ـ تروق في الزيلول وتطمر في بلسم كندا أو .D.P.X.

النتيجة: البروتينات تصطبغ باللون الأزرق الغامق الواضح.

٢ ـ طريقة النهيدرن ـ شف للبروتينات

Ninhydrin - Schiff method for protein- bound NH_2

(Yasuma and Itchikawa, 1953, in Pearse, 1960)

يفضل كل من العالمان (Yasuma and Itchikawa) ، واللذان حضرا الصبغة لأول مرة عام ١٩٥٣م استخدام القطاعات المثبتة في مثبت زنكر أو الكحول الاثيلي المطلق. أما العالم (Pearse) فهو يفضل استخدام مثبت ٨٥٪ كحول إثيلي أو مثبت كارنوى أو ٥٪ الكحـول الحمضي (5% acetic-ethanol). كما يمكن صبـغ القطاعات المحضرة باستخدام الميكروتوم الثلجي.

طريقة العمل

١ ـ تمرر القطاعات في سلسلة متدرجة تنازليا لتراكيز مختلفة من الكحول الإثيلي لغرض إرجاع الماء إليها.

٢ ـ تعامل القطاعات بمحلول النهيدرن ٥٪ في الكحول الاثيلي لمدة تتراوح ما بين ١٦ ـ ٢٠ ساعة عند درجة حرارة ٣٧°م.

٣ ـ تغسل القطاعات بعناية في ماء الحنفية الجارى لمدة ٢ ـ ٥ دقائق.

٤ ـ تغمس القطاعات في كاشف شف (Schiff's reagent) لمدة ١٥ ـ ٢٥ دقيقة.

٥ ـ تغسل القطاعات في ماء الصنبور الجاري لمدة عشر دقائق.

٦ ـ تجفف ثم تروق بمحلول الزيلول وتطمر في مادة الطمر المناسبة.

ملاحظة: عند الرغبة في صبغ الأنوية في القطاعات يجب تمرير القطاعات بعد الخطوة رقم (٥) في محلول ماير هيمالوم (Mayer's haemalum) ، ثم تغسل وتمرر على ١٪ كحول إثيلي حمضي.

النتيجة: البروتينات تصطبغ باللون الوردي المحمر إلى الأرجواني إذا كانت توجد في الخلايا كمية كافية من مجاميع الأمين النشطة.

٣ ـ طريقة الكلورامين (T) شف للكشف عن رابطة بمجموعة الأمين في البروتينات
Chloramine-T Schiff method for protein-bound NH_2(Pearse, 1968)

هذه طريقة أخرى للكشف عن مجموعة الأمين في البروتينات، ويستحسن استخدام مثبت كارنوى أو الأستون البارد.

طريقة العمل

١ ـ يرجع الماء إلى القطاعات (Hydration).

٢ ـ تعامل هذه القطاعات بمحلول ١٪ كلورامين (T) (ذو أس هيدروجيني ٥ , ٧) لمدة ست ساعات عند درجة ٣٧°م (ممكن استخدام محلول ١٠٪ هيبوكلوريت الصوديوم التجاري بدل من محلول الكلورامين (T)).

٣ ـ تغسل لفترة قصيرة في ماء مقطر.

٤ ـ تعامل القطاعات بمحلول ٥٪ ثيوكبريتات الصوديوم المائية لمدة ثلاث دقائق.

٥ ـ تغمس القطاعات في ماء مقطر ومن ثم توضع في محلول شف لمدة ٢٠ ـ ٣٠ دقيقة.

٦ ـ تغمس القطاعات في محلول ١٠٪ ثنائي كبريتيد الصوديوم المائي (Sodium bisulphite).

٧ ـ تغسل في ماء الحنفية.

٨ ـ ينزع الماء بالكحولات المتدرجة التركيز وتروق في الزيلول، ومن ثم تطمر في مادة D P X.

النتيجة: تصطبغ مجاميع الأمين في البروتينات باللون القرنفلي (أحمر وردي) (Pink) أو اللون الأحمر الأرجواني (Reddish-Magenta).

٤ ـ طريقة الأيسوسيانين الكاذب للكشف عن الأنسولين وغيره
Pseudoisocyanin method for insulin, etc. (Schicbler and Schiessler, 1958; Wolff, 1965, in Pearse, 1968).

يفضل استخدام عدد من المثبتات عندما نريد الكشف عن هرمون الأنسيولين ومنها مثبت بوان، سوسا وزنكر والفورمالين وكارنوى والكحول الأثيلى.

طريقة العمل

١ ـ يرجع الماء إلى القطاعات.

٢ ـ توضع القطاعات في حمض البيرفورمك (Performic acid) لمدة ساعة لكي تتم أكسدتها أو في محلول البرمنجنات الحمضية (١٠ مل من ٢,٥٪ برمنجنات البوتاسيوم و١٠ مل من ٥٪ حمض الكبريت و٧٠ مل من الماء المقطر)، وتعامل بها القطاعات لنفس الفترة السابقة.

ملاحظة: يحضر حمض البيرفورمك كما يلي:
يضاف ٤ مل من ٣٠٪ فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2 (١٠٠ حجم) و٠,٥ مل حمض الكبريت المركز إلى ٤٠ مل ٩٨٪ حمض الفورميك. محلول فوق أكسيد الهيدروجين يجب أن يكون حديث التحضير. حمض البيروفورمك يجب أن يخلط جيدا في الزجاجة بقضيب زجاجي قبل الاستعمال. وعادة مدة الأكسدة تتراوح ما بين ١٥ ـ ٦٠ دقيقة عند درجة حرارة الغرفة.

٣ ـ تصبغ القطاعات لمدة ٢ ـ ١٥ دقيقة في المحلول المائي لصبغة الأيسوسانين الكاذب الحديث التحضير (تحضر هذه الصبغة بإذابة ٨,٦ مجم من N, N-diethyl-6, 6-dichloropseudoisocyaminl chloride في نقاط قليلة من الكحول المثيلى، ثم تضاف إلى ١٠٠ مل من الماء المقطر الساخن. تسخن لمدة ٥ دقائق ثم تبرد وترشح).

٤ ـ تغمس القطاعات في ماء النشادر (نقطة واحدة من ٠,٣٨ نشادر في ١٠٠ مل ماء).

٥ ـ تفحص القطاعات في هذا الوسط أو في أي مادة طمر ذات وسط مائي قاعدي.

النتيجة: جيبات (B) في جزر البنكرياس تعطي لون أحمر براق Metachromasia (fluorescent).

الحموض النووية Nucleic Acids

١ ـ تفاعل فولجن The Feulgen Reaction

تحضير كاشف شف Schiff's reagent (DeTomasi, 1956 in Pearse 1968)

يذاب ١ جم من الفوشين القاعدي (Basic fuchsin) في ٢٠٠ مل من الماء المقطر الذي يغلي. يحرك جيدا لمدة خمس دقائق ويترك المحلول يبرد حتى تصل درجة حرارته إلى ٥٠°م ثم يرشح. يضاف ٢٠ مل من محلول ١ عياري حمض الهيدروكلوريك إلى الرشاحة. عندما يبرد المحلول وتصل درجة حرارته إلى ٢٥°م يضاف ١ جم من ثنائي ميتاكبريتيات الصوديوم أو البوتاسيوم.

(Sodium (or Potassium) metabisulphite, $Na_2S_2O_3$)

يحفظ المحلول في الظلام لمدة ١٦ ـ ٢٤ ساعة ثم يضاف ٢ جم من بودرة الفحم المنشط (Activated charcoal) ويحرك لمدة دقيقة واحدة ثم يرشح وتحفظ الرشاحة في مكان مظلم وعند درجة صفر ـ ٤°م. وعند الاستعمال يجب ترك المحلول يسخن حتى تصبح درجة حرارته مشابهة لدرجة حرارة الغرفة.

ملاحظة: هناك طرق أخرى لتحضير محلول شف مذكورة في كتاب بيرس ـ المجلد الأول، ١٩٦٨م، (Pearse Vol. 1, 1968).

محلول غسيل ثاني الكبريتيت Disulphite wash

هذا المحلول يجب تحضيره طازجا عند كل عملية صبغة ويتم تحضيره كما يلي:

١٠٪ محلول ثاني كبريتيت الصوديوم أو البوتاسيوم	٥ مل
١ ع محلول حمض الهيدروكلوريك	٥ مل
ماء مقطر	٩٠ مل

هذا وجميع المثبتات يمكن استخدامها في حالات كشف فولجين ما عدا مثبت البوان (Bouins's fixative).

طريقة العمل

١ ـ يرجع الماء إلى القطاعات.
٢ ـ تغمس القطاعات لمدة قصيرة في محلول ١ع حمض الهيدروكلوريك البارد.
٣ ـ تنقل القطاعات إلى محلول ١ع حمض الهيدروكلوريك عند ٦٠°م وتترك وقتا كافيا لإتمام تحلمؤها (Hydrolysis).
٤ ـ تغمس القطاعات لمدة قصيرة في محلول ١ع حمض الهيدروكلوريك البارد، ومن ثم تغمس في الماء المقطر.
٥ ـ تنقل القطاعات الى كاشف شف لمدة ٣٠ ـ ٦٠ دقيقة.
٦ ـ تغسل القطاعات في ثلاثة محاليل من محلول غسيل ثاني الكبريتيت.
٧ ـ تغمس القطاعات في الماء المقطر.
٨ ـ ينزع الماء بتركيزات تصاعدية من الكحول الأثيلي.
٩ ـ تروق بمحلول الزيلول ثم تطمر في بلسم كندا أو D. P. X.

النتيجة

الحمض النووى الرايبوزى اللاأوكسجيني (DNA) يصطبغ باللون الأحمر.

ملاحظة

١ ـ لعمل طريقة قياسية (Control) ممكن إجراء الطريقة وإهمال عملية التحلمؤ، أو ممكن هضم الحمض النووى اللاأوكسجيني (DNA) بالأنزيم (Dnase).
٢ ـ يعتمد زمن التحلمؤ على نوع المثبت المستخدم وهذا الزمن عند استخدام ٠,٥ع حمض الهيدروكلوريك عند درجة حرارة الغرفة هو:

المثبتات الكحولية: ٢٠ دقيقة ـ ساعتين
مثبتات الفورمالين: ٤٠ دقيقة ـ أربع ساعات
أبخرة الفورمالدهايد في حالة القطاعات المبردة: ٢ ـ ٨ ساعات.

٢ ـ طريقة أخضر الميثيل والبيرونين Methyl green/Pyronin technique (Scott, 1967) للكشف عن الحموض النووية

تحضير المحاليل

ا ـ يذاب ١ جم من أخضر الميثيل في ١٠٠ مل من محلول ٠,٠٥ جزيء خلات الصوديوم المنظمة (PH 5.6) ويرج المحلول مع حجم مساو له من الكلورفورم في قمع فصل. تكرر عملية فصل الكلورفورم الملون وإضافة كمية أخرى منه حتى يصبح الكلورفورم عديم اللون.

ب ـ يذاب ١ جم من بيرونين G)Y) (Pyronin Y (G)) في ١٠٠ مل من محلول ٠,٠٥ جزيء خلات الصوديوم المنظمة (pH5.6) ، ثم تطبق نفس الطريقة كما في المحلول أ بالنسبة للغسيل بالكلورفورم.

ولكي تحضر الصبغة النهائية، يخلط ١٥ مل من محلول أ مع ٢٥ مل من محلول ب، ثم يكمل الحجم إلى ١٠٠ مل بإضافة محلول ٠,٠٥ جزيء من محلول الخلات المنظم (pH5.6) بعدها يذاب ٠,٤٠ جم كلوريد المغنسيوم المائي ($MgCl_2.6H_2O$) في المحلول النهائي.

كما يحبذ استخدام مثبتات الفورمالدهايد أو مثبت كارنوى أو ٧٠٪ كحول إثيلي لهذا الغرض.

طريقة العمل

١ ـ يرجع الماء إلى القطاعات.

٢ ـ تصبغ القطاعات في الصبغة النهائية ليلة كاملة (١٦ ساعة).

٣ ـ تغمس القطاعات في ماء مقطر.

٤ ـ ينزع الماء بمحلولين من كحول البيوتين (n-butanol) ، خمس دقائق في كل واحد.

٥ ـ تروق في محلول الزيلول ثم تطمر في .D.P.X

النتيجة

الحمض النووى الريبوزى (RNA) يصطبغ باللون الأحمر، أما الحمض النووى الريبوزى اللاأوكسجيني (DNA) فيصطبغ باللون الأخضر.

لعمل تفاعل ضبط (Control) ممكن هضم قطاعات مختلفة بأحد إنزيمي RNase أو DNase.

ا - يذاب ٠,٠٥ مجم/١ مل من بلورات إنـزيم الحمض النـووى الريبوزى اللاأوكسجيني (Deoxyribonuclease) في محلول منظم ترس (pH.5.7) (Tris buffer) والذي يحتوي على ٠,٢ جزيء كبريتات المغنسيوم.

ب - يذاب ١ مجم/١ مل من بلورات إنزيم الحمض النووى الريبوزي (أ) (Ribonuclease A) في محلول الفوسفات المنظم (pH.6.4).

تعامل القطاعات بعد الخطوة رقم(١) في الطريقة الآنفة الذكر بأحد المحلولين (ا أو ب). وبالنسبة للقطاعات المعاملة بمحلول ا (Dnase) يجب حضنها عند ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة. أما في حالة القطاعات المعاملة بمحلول ب (RNase) فتترك عند درجة حرارة الغرفة لمدة ثلاث ساعات.

بعـد معاملة القطاعات في أي من محلولي ا أو ب حسب المدة المذكورة تغمس القطاعات في خمس أوان تحتوي على الماء المقطر ثم تكمل الطريقة كما ذكر في طريقة العمل.

النتيجة

في حالة معاملة القطاعات بمحلول ا فسوف تكون النتيجة اصطباغ الـ RNA باللون الأحمر، أما DNA فقد هضم بواسطة الأنزيم DNase ولا يوجد نتيجة للتفاعل. أما في حالة المحلول ب فيكون العكس اصطباغ الـ DNA باللون الأخضر أما الـ RNA فقد تم هضمه بواسطة الـ RNase.

الكشف عن الإنزيمات

١ ـ طريقة مركب الكالسيوم والكوبالت للكشف عن إنزيم الفوسفاتيز القاعدي

Calcium-cobalt method for alkaline phosphatase (after Gomori, 1962)

لعمـل هذا الكشف يمكن استخـدام كل من قطاعـات الـبرافين أو قطاعات الميكروتم الثلجي، ولكن من الأفضل استعمال القطاعات الثلجية إذ أن هذه الطريقة تقلل من تكسير أو تحطيم الإنزيمات. وسوف نتطرق لوصف طريقة الكشف عن هذا الإنزيم بواسطة القطاعات الثلجية.

طريقة تحضير البيئة الإنزيمية Substrate preparation

لتحضير هذه المادة تخلط المواد التالية:

١ ـ ١٠ مل من ٣٪ فوسفات الصوديوم الجلسرينية (B) Sodium -glycerophosphate.

٢ ـ ١٠ مل من ٢٪ Sodium diethyl barbiturate.

٣ ـ ٥ مل ماء مقطر.

٤ ـ ٢٠ مل من ٢٪ كلوريد الكالسيوم.

٥ ـ ١ مل من ٥٪ كبريتات المغنسيوم.

طريقة العمل

١ ـ تقطع القطاعات بسمك (١٠ ـ ١٥ ميكرون) باستخدام الميكروتوم الثلجي، ثم توضع على شريحة زجاجية نظيفة بدون استخدام أية مادة لاصقة.

٢ ـ تترك القطاعات تجف في الهواء عند درجة حرارة الغرفة لمدة ١ ـ ٢ ساعة.

٣ ـ تحضن القطاعات في محلول البيئة الإنزيمية (Substrate) لمدة نصف إلى أربع ساعات عند درجة ٣٧°م.

٤ ـ تغسـل القطاعات بالماء، ثم تعامل بـ ٢٪ محلول الكوبالت وتغسل بالماء وبعدها تعامل بمحلول كبريتيد الأمونيوم الأصفر المخفف (Yellow ammonium sulphide).

٥ ـ تصبغ الأنوية بمحلول ١٪ أيوسين مائي لمدة خمس دقائق.
٦ ـ تغسل القطاعات في ماء جارى لمدة خمس دقائق.
٧ ـ تطمر القطاعات في مادة هلام (جيلاتين) الجلسرين (Glycerine jelly).

النتيجة

التراكيب الخلوية التي تصطبغ باللون الأسود أو البنى المسود تحتوي على إنزيم فوسفاتيز قاعدي نشيط.

٢ ـ طريقة نترات الرصاص للكشف عن إنزيم الفوسفاتيز الحمضي

Iead nitrate method for acid phosphatase (after Gomori, 1952)

في هذه الطريقة يمكن استخدام عدة مثبتات وكذلك يمكن استخدام كل من القطاعات الشمعية أو الثلجية ولكن يفضل استخدام القطاعات الثلجية.

طريقة العمل

١ ـ تحضن القطاعات عند درجة ٣٧°م لمدة ١٥ ـ ٣٠ دقيقة وقد يحتاج هذا الوقت إلى زيادة تصل إلى أربع ساعات في محلول حديث التحضير من ٠,٠١ جزيء فوسفات الصوديوم الجلسرينية (B) في ٠,٠٥ جزيء من محلول الخلات المنظم (pH5) والذي يحتوي على ٠,٠٠٤ جزيء من نترات الرصاص.
٢ ـ تغسل لمدة قصيرة في الماء، ثم تغمس القطاعات في محلول مخفف من كبريتيد الأمونيوم الأصفر لمدة دقيقة إلى دقيقتين.
٣ ـ تغسل القطاعات بالماء، ثم تصبغ الأنوية بواسطة ١٪ محلول الإيوسين المائي لمدة خمس دقائق.
٤ ـ تغسل القطاعات جيدا وبعدها تطمر في الجلسرين الجلاتيني.

النتيجة

الأماكن الموجود فيها حمض الفوسفاتيز في القطاعات ينتج فيها راسب أسود من كبريتيد الفضة.

الكشف عن الدهون Lipids

الـدهون غالبا تذوب في المواد الكيميائية التي تستخدم لتجفيف العينات المراد طمـرهـا في شمـع الـبرافـين، مثل الكحول والاستون. لذلك يحبذ دائما استخدام القطاعات الثلجية للكشف عن الدهون.

وإن تعذر وجود القطاعات الثلجية فمن الأفضل استعمال طريقة العالم مكمانس (McManus in Pearse, 1960) عام ١٩٤٦ لعمل القطاعات المطمورة في شمع البرافين وهذه الطريقة تتلخص في الآتي:

ثبت مكمانس العينات المراد الكشف عليها لمدة أسبوع إلى خمسة أسابيع عن طريق إذابة ١ جم من نترات الكوبالت في ٨٠ مل ماء مقطر وإضافة ١٠ مل من ١٠٪ كلوريد الكالسيوم و١٠ مل من ٤٠٪ فورمالين. هذا وقد فضل اتباع التثبيت بوضع العينات في ٣٪ ثاني كرومات البوتاسيوم لمدة يوم إلى يومين (٢٤ ـ ٤٨ ساعة).

ينتزع الماء من العينات بعد اكمال عملية التثبيت بوساطة ثلاثة محاليل من الأسيتون تترك نصف ساعة في كل منهما، ثم توضع مباشرة في شمع برافين ذائب.

١ ـ طريقة أسود سودان «ب» للكشف عن الدهون .Sudan Black B

تحضير الصبغة

يذاب ٠,٧ جم من أسـود سودان «ب» في ١٠٠ مل من (Propylene glycol) النقي بواسطة التسخين إلى ١٠٠ ـ ١١٠°م. يحرك المحلول بشدة ولا تترك درجة الحرارة ترتفـع فوق ١١٠°م. يُرشح المحلول وهو ساخنا مستعملا ورق الترشيح من نوع واتمان (Whatman)رقم «٢». تبرد الرشاحة ويعاد الترشيح عند درجة حرارة الغرفة (نظرا لما يأخذه الترشيح الثاني من زمن طويل فإنه يمكن الترشيح مستخدما قمع بوخنر).

طريقة العمل

١ ـ تحضر مجموعة من القطاعات الثلجية من عينات طازجة أو مثبتة بالفورمالدهيد.

٢ ـ تغسل القطاعات في الماء لمدة ٢ ـ ٣ دقائق.

٣ ـ ينتزع الماء بواسطة محلول الـ «Propylene glycol» النقي لمدة ٢ ـ ٣ دقائق. ولما لهذا المحلول من لزوجة عالية فيستحسن تحريك القطاعات خلال زمن التجفيف.

٤ ـ تصبغ القطاعات في محلول أسود سودان «ب» لمدة ٥ ـ ٧ دقائق.

٥ ـ تغسل القطاعات في ماء مقطر لمدة ٣ ـ ٥ دقائق.

٦ ـ تطمر القطاعات في مادة هلام الجلسرين.

النتيجة

جميع الدهون ما عدا المغلفة (Masked lipids) تصطبغ باللون الأسود.

٢ ـ طريقة أسود سودان «ب» للدهون المغلفة

Sudan Black B method for masked lipids. (Acherman, 1952, in Pearse, 1960)

تستخدم هذه الطريقة للكشف عن الدهون في سحبة الدم.

طريقة العمل

١ ـ تثبت سحبة الدم في أبخرة الفورمالين لمدة ٢ ـ ٥ دقائق.

٢ ـ تغمس سحبة الدم في ٢٥٪ حمض الخل لمدة دقيقتين.

٣ ـ تغسل سحبة الدم في ماء جارى ثم في الماء المقطر وتترك بعدها لتجف.

٤ ـ تصبغ في محلول أسود سودان «ب» المشبع في ٧٠٪ كحول أثيلي (يجب استخدام محلول صبغة محضر على الأقل قبل أسبوع من زمن الصبغ).

٥ ـ تمرر السحبات على محلول ٧٠٪ كحول إثيلي.

٦ ـ تجفف بورق الترشيح وتطمر في هلام الجلسرين.

النتيجة

الدهــون المغلفة تصطبغ باللون الأسود.

٣ ـ طريقة الأحمر الزيتي «O» للكشف عن الدهون المتعادلة

The oil Red O for neutral lipids (Lillie, 1965)

تحضير الصبغة

يذاب ٠,٥ جم من أحمر الزيت (O) في ١٠٠ مل كحول الأيسوبروبيل (٩٨٪) ولاستخدام هذه الصبغة يخفف ٦مل من هذا المحلول بإضافة ٤ مل ماء مقطر، يترك المحلول جانبا لمدة ٢٤ ساعة ويرشح مستخدما ورق ترشيح من نوع (Whatman No. 42) قبل الاستخدام مباشرة.

طريقة العمل

١ ـ تثبت العينات في الفورمالدهيد ثم تحضر بعض القطاعات الثلجية.
٢ ـ تغمس القطاعات في محلول كحول أيسوبروبيل (٦٠٪) حديث التحضير.
٣ ـ تصبغ في محلول أحمر الزيت (O) لمدة عشر دقائق.
٤ ـ تغمس القطاعات في الماء.
٥ ـ تطمر في هلام الجلسروين.

النتيجة: الدهون المتعادلة تصطبغ باللون الأحمر.

الكشف عن المواد السكرية (الكربوهيدراتية)

مجموعة السكريات مجموعة هامة من المركبات العضوية وصيغتها الكيميائية العامة هي $(CH_2O)_n$ حيث (n) من ثلاثة فما فوق.

تصنع المواد السكرية في النباتات الخضراء بواسطة عملية التركيب الضوئي (Photosynthesis) وكذلك يقوم الحيوان هو الآخر بتمثيل بعض المركبات السكرية مثل الجليكوجين (النشاء الحيواني). تعتبر المواد السكرية من المواد الأساسية الرئيسية سواء

بالنسبة للحيوان أو النبات لما لهذه المواد من صفة تخزينية للطاقة ويطلق عليها أحيانا مستودعات الطاقة، هذا وتصنف السكريات إلى ثلاثة مجاميع حسب عدد ذرات الكربون المشتركة وهي :

١ ـ سكريات أحادية التسكر Monosaccharides
٢ ـ سكريات قليلة التسكر Oligosaccharides
٣ ـ سكريات عديدة التسكر Polysaccharides

ونظرا لتعدد أنواع السكريات فهناك طرق مختلفة للكشف عنها وسوف نتطرق لبعض منها.

طريقة حمض البيريوديك ـ شف للكشف عن السكريات

The Periodic Acid - Schiff (PAS) technique (After McManus, in Pearse, 1960)

طرق تحضير المحاليل

١ ـ حمض البيريوديك Periodic acid

يذاب ٠,٤ جم من حمض البيريوديك ($HIO_4,2H_2O$) في ٣٥ مل من الكحول الإثيلي، ثم يضاف ٥ مل من ٠,٢ جزيء خلات الصوديوم (٢٧,٢ جم من خلات الصوديوم المائية في ١٠٠٠ مل ماء مقطر) و١٠ مل ماء مقطر. هذا المحلول يجب أن يحفظ في الظلام عند ١٧ ـ ٢٢°م وكذلك يستخدم هذا الحمض عند هذه الدرجة ويجب عدم استعمال الحمض عندما يتحول إلى اللون البني.

٢ ـ حمام الاختزال Reducing bath

يذاب ١ جم من يوديد البوتاسيوم و١ جم ثيوكبريتيت الصوديوم ($Na_2S_2O_35H_2O$) في ٣٠ مل من الكحول الإثيلي و٢٠ مل من الماء المقطر. يضاف نصف مل من ٢ع ـ حمض الهيدروكلوريك (٢٠٪ من الحمض المركز)، ربما يتكون راسب من الكبريت ولكن يمكن تجاهله وتركه. يحفظ المحلول ما بين ١٧ ـ ٢٢°م، والمحلول هذا صالح للاستعمال لمدة لا تزيد على أربعة عشر يوما.

٣ ـ محلول (كاشف) شف Schiff's reagent

لقد سبق وأن شرحت طريقة تحضير هذا الكاشف التي وصفها العالم دى توماس (Detomasi, in Pearse, 1960) عام ١٩٣٦م في تفاعل فولجين، وبما أن هناك عدة طرق لتحضير هذا الكاشف إلا أنه من الأفضل ذكر طريقة أخرى لتحضيره (وهي طريقة بارقر ودى لاماتر (Barger and Delamater, in Pearse, 1960، ١٩٤٨م)، مع العلم أن هذه الطريقة قد زكيت من قبل العالم بيرس ١٩٦٨م. والطريقة كما يلي:

يذاب ١ جم من الفوشين القاعدي (Basic fuchsin) في ٤٠٠ مل من الماء المقطر الذي يغلي. يبرد حتى درجة ٥٠°م ثم يرشح، وللرشاحة يضاف ١ مل محلول كلوريد الثيونيل (thionyl chloride, $SOCl_2$). يترك في الظلام لمدة ١٢ ساعة ثم يضاف ٢ جم من مسحوق الكربون النشط ويرج لمدة دقيقة واحدة، ثم يرشح وتحفظ الرشاحة في الظلام عند درجة صفر ـ ٤°م. ويستخدم هذا المحلول في الظلام عند درجة حرارة الغرفة.

طريقة العمل

١ ـ يرجع الماء إلى القطاعات.
٢ ـ تؤكسد القطاعات لمدة عشر دقائق في ١٪ حمض البيريوديك المائي.
٣ ـ تغسل القطاعات في الماء الجاري لمدة خمس دقائق.
٤ ـ تغمس القطاعات في كاشف شف لمدة عشر دقائق.
٥ ـ تغسل القطاعات في الماء الجاري لمدة خمس دقائق.
٦ ـ يمكن عند الرغبة وذلك بمعاملة القطاعات بصبغة ماير هيمالوم كما سبق ذكره في (ص ٩٩).

وللتأكد (Control) من نتيجة التفاعل يجب إهمال خطوة الأكسدة بحمض البيروديك وإكمال بقية الطريقة كما ذكر آنفا.

النتيجة

السكريات السداسية والتي تحوى مواد مخاطية تصطبغ بألوان مختلفة من القرنفلي المحمر. أما الجليكوجين فيعطي صبغة غامقة من نفس اللون.

الكشف عن الكيتين Chitin

لا توجد هناك طريقة كيميائية بسيطة للكشف عن الكيتين ولكن العالم ريتشارد عام ١٩٥١ (Richards, 1951) وصف طريقة للكشف عن الكيتوسان (Chitosan) وهي طريقة نافعة جدا ولكنها تحطم الأنسجة الأخرى، وهي كما يلي:

ا - توضع قطعة صغيرة من عينة تحتوى على مادة الكيتين (قطعة من جدار جسم حشرة مثلا) المراد الكشف عليها، ويحاول، قدر الامكان، تخليصها من الأنسجة المتصلة، يضاف محلول مشبع من هيدروكسيد البوتاسيوم في أنبوبة اختبار بحيث يغمر القطعة عند درجة حرارة الغرفة. يجب أن تكون أنبوبة الاختبار مغلقة بصمام بنزن (Bunsen valve). (وهذا الصمام هو عبارة عن قطعة من أنبوبة مطاطية ذات عدة سنتيمترات في الطول وتكون مقفلة عند أحدي نهايتيها بماسكة (Clip) مع مراعاة عمل قطع جانبي ($\frac{1}{2}$ - ١ سم في الطول) في الأنبوبة وبالقرب من موضع الماسكة وهذه الأنبوبة المطاطية توصل إلى أنبوبة الاختبار الزجاجية مباشرة أو باستعمال غطاء مطاطي Rubber stopper). تسخن الأنبوبة تدريجيا في حمام جلسرولي (موضوع في حمام مائي مضاف إليه جلسرول) حتى تصل إلى ١٦٠°م، ومن ثم تثبت عند هذا الحد لدرجة الحرارة لمدة حوالي خمس عشرة دقيقة.

ب - يبرد المحلول إلى درجة حرارة الغرفة، وبهذا تتحول المواد المتبقية من الكيتين إلى الكيتوسان (Chitosan). ينقل الكيتوسان إلى الماء، ثم توضع هذه القطعة على شريحة زجاجية وتغطى بنقاط من ٢ , ٠٪ يود في محلول أيودات البوتاسيوم. مادة الكيتين سوف تتلون باللون البني ويستحسن أن تزال الزيادة من محلول اليود وتستبدل بـ ١٪ حمض الكبريت. الكيتين سوف يتحول لونه إلى البنفسجي المحمر. ويمكن تغطيتها بمادة بلسم كندا وحفظها لمدة أطول.

الكشف عن السليلوز Cellulose Test

للكشف عن السليلوز يمكن استخدام محلول شلوتز (Schultz's solution) مثلا. وطريقة تحضيره كما يلي:

يحضر ٥٠ جم كلوريد الزنك و١٦ جم يوديد البوتاسيوم و١٧ مل ماء مقطر ثم يمزج الخليط، بعدها يضاف زيادة من محلول اليود ويترك الخليط لعدة أيام في قارورة زجاجية بنية اللون.

تستعمل العينات الطازجة أو المثبتة ولكن لا يحبذ استعمال المثبتات التي تحوى على الكروم.

طريقة العمل

١ - توضع القطاعات (بعد إزالة الشمع منها وإمرارها في تركيزات تنازلية من الكحول الأثيلي حتى الماء) في نقاط قليلة من السائل آنف الذكر.

٢ - تفحص القطاعات وهي لا تزال في المحلول.

النتيجة

الجدر الخلوية التي تحوى على كمية من السليلوز تصطبغ باللون الأزرق. بينما الجدر التي تحتوى على كمية كبيرة من اللجنين Lignin والكيوتين Cutin والسوبرين Suberin أو الكيتين Chitin فتصطبغ باللون الأصفر.

الكشف عن النشاء Starch Test (stain)

يذاب ٢ جم من يوديد البوتاسيوم في ١٠٠ مل ماء مقطر، ثم يضاف ٠,٢ جم من اليود.

توضع القطاعات من العينة الطازجة في نقطة من هذا المحلول لعدة دقائق، النشا سوف يصطبغ باللون الأزرق المسود بينما النشا حديث التكون ربما يصطبغ باللون الوردي المحمر. عند ترك بعض القطاعات في المحلول لمدة خمس عشرة دقيقة أو أكثر ثم إضافة نقطة من ٦٥٪ من حمض الكبريت والفحص مباشرة.

النتيجة

الجدر الخلوية التي تحتوى على السليلوز سوف تصطبغ باللون الأزرق بينما التي تحتوي على اللجنين سوف تأخذ اللون الأصفر.

الكشف عن اللجنين Legnin Test

تصبغ بعض القطاعات من العينات المثبتة أو الطازجة في محلول الفلوروجلوسين (Phloroglucin) المشبع في ٢٠٪ حمض الهيدروكلوريك.

النتيجة

اللجنين سوف يصطبغ باللون البنفسجي المحمر.

طريقة أزرق الألشيان للكشف عن عديدات التسكر المخاطيةالحمضية

Alcian Blue method for acid mucopolysaccharides (after Steedman, 1950, in Pearse 1960)

طريقة العمل

١ ـ يرجع الماء إلى القطاعات.

٢ ـ تصبغ القطاعات في محلول حديث التحضير من ١٪ أزرق الألشيان ٨ جي اكس (8GX) في ٣٠٪ حمض الخل لمدة ١٠ ـ ٣٠ دقيقة. ويمكن استعمال أزرق الألشيان 3GX أو 2GX.

٣ ـ تغمس في الماء المقطر.

٤ ـ تصبغ القطاعات في محلول إيرلنج هيمالوم (Ehrlich's haemalum) لمدة ٥ ـ ١٠ دقائق.

٥ ـ تنقل القطاعات في سلسلة من محاليل ١٪ كحول إثيلي.

٦ ـ تغسل القطاعات في ماء جارى لمدة ١٠ ـ ٢٠ دقيقة.

٧ ـ ينتزع الماء من القطاعات باستخدام الكحول الإثيلي ثم تروق في الزيلول وتغطى في بلسم كندا أو D.P.X..

النتيجة

عديدات التسكر المخاطية الحمضية تصطبغ باللون الأزرق المخضر، أما الأنوية فتكون زرقاء أو حمراء غامقة.

طريقة الكارْمين للكشف عن النشا الحيواني

Carmine stain for glycogen (after Best, 1906, in Pearse, 1968).

يمكن استخدام العينات المثبتة في مثبت بوان وكارنوى والكحول والفورمالين وغيرها وباستعمال القطاعات البرافينية.

تحضير المحاليل

ا - محلول الكارمين **Carmine stock solution**

يضاف ٢ جم كارمين و١ جم كربونات البوتاسيوم و٥ جم كلوريد البوتاسيوم إلى ٦٠ مل ماء مقطر. يغلى الخليط بلطف لمدة خمس دقائق، يبرد ثم يرشح. يضاف إلى الرشاحة ٢٠ مل من النشادر (Ammonia) ثقله النوعي ٠,٨٨ (sp. g. 0.880). هذا المحلول يستمر صالحا للاستعمال لمدة تصل إلى ثلاثة أشهر إذا حفظ عند صفر - ٤°م.

ب - محلول كارمين للصبغ **Carmine staining solution**

يخفف ١٥ مل من محلول الكارمين (فقرة أ) بإضافة ١٢,٥ مل من النشادر و١٢,٥ مل كحول مثيلي. هذا المحلول صالح للاستعمال لمدة أسبوعين إلى ثلاثة أسابيع.

جـ - مفاضل بست **Best's differentiator**

يتم تحضيره بخلط ٨ مل كحول مطلق مع ٤ مل كحول مثيلي و١٠ مل ماء مقطر.

طريقة العمل

١ - ينتزع الماء من القطاعات (Dehydration).

٢ ـ توضع القطاعات في ١٪ سيللوديدين مذاب في خليط من الكحول الإثيلي المطلق والإثير بنسب متساوية ولمدة دقيقتين.

٣ ـ تجفف القطاعات في الهواء.

٤ ـ تمرر القطاعات من خلال الكحول إلى الماء (Hydration).

٥ ـ تصبغ في محلول ايرلنج هيمالوم لمدة خمس دقائق.

٦ ـ تغمس وبسرعة في عدة محاليل من ١٪ كحول حمضي.

٧ ـ تغمس في الماء.

٨ ـ تصبغ في صبغة كارمين بست لمدة ١٥ ـ ٣٠ دقيقة.

٩ ـ تغمس القطاعات في مفاضل بست (٥ ـ ٦٠ ثانية).

١٠ ـ تغسل القطاعات في ٨٠٪ كحول إثيلي.

١١ ـ ينتزع الماء منها بالكحول الإثيلي المطلق، تروق بالزيلول، ثم تغطى في الـ .D.P.X والغطاء الزجاجي.

النتيجة

الأنوية تصطبغ باللون الأزرق الغامق، أما الجليكوجين فيعطي لونًا أحمر. وللتأكد (Control) من نتائج هذا الكشف تعامل القطاعات بمحلول إنزيم الدايستيز Diastase في حمام مائي عند درجة حرارة ٣٧°م لمدة نصف ساعة.

التصوير الإشعاعي الذاتي

● مقدمة ● استعمال النظائر المشعة ● تحضير الخلايا والأنسجة ● إعداد فلم التصوير الحساس ● مدة التعريض للإشعاع ● طريقة الإظهار والتثبيت ● الفحص المجهري

مقدمة

يمكن اعتبار التصوير الإشعاعي الذاتي نمطا خاصا يهدف أساسا إلى تسهيل دراسة كيمياء الخلايا والأنسجة. فلقد أستغلت العناصر المشعة مثل عنصر التريتيوم (Tritium ^{3}H) والكربون (^{14}C) والفوسفور (P^{32}) والكبريت (S^{35}) كعناصر مرقمة (Label). مثل هذه العناصر سهلت على المهتمين بكيمياء الخلية عمليات تتبع ما يجرى داخل الخلايا من تفاعلات كيميائية حيوية، وذلك بتعريض الخلايا لجزيئات مادة معينة ومشععة بأحد العناصر المشعة وبشرط أن هذه المادة تدخل في تركيب أو بناء الخلية. ونظرا لأن مادة الثيمدين (Thymidine) تدخل في بناء المادة المعروفة بمادة الحمض النووى الريبوزي اللاأوكسجيني (DNA) فلقد استخدمت مادة الثيمدين المشععة بالتريتيوم (^{3}H-T d R) (Tritiated thymidine) لتتبع ما يحدث لمادة الـ DNA أثناء هيمنتها على نشاطات الخلية. كما يمكن استخدام مادة اليوريدين المشعة بالتريتيوم (Tritiated uridine) (H^{3}- U d R) لتتبع عملية تمثيل الحمض النووى

الـريبوزي الأوكسجيني (RNA) وبـالإمكـان أيضا استخدام مختلف أنواع الحموض الأمينية المعـروفـة بعـد تشعيعهـا بالـتريتيوم أو الكـربون (^{14}C) لتتبع عمليات البناء الـبروتيني. عنـدمـا نعـرض الخـلايا الحية لجزيئات المادة المعينة المشععة ولمدة زمنية معـروفـة تثبت على شريحـة مجهـرية، ثم تغـطى في الـظلام بفلم تصويرى حساس (Photographic film) خاص لهذا الغرض. تترك الخلايا مدة من الزمن في الظلام حتى يتم تعرض الفلم للوميض الذي ينطلق من المادة المشعة والممتص من قبل الخلايا. بعدها يحمض الفلم ويثبت قبل تعريضه للضوء، كما يحدث تماما في التصوير العادي. وفي النهاية تفحص الشريحة تحت المجهر وبهذا يمكن مشاهدة آثار المادة المشعة في مناطق امتصاصها في الخلية والتي منها يمكن تحليل النتائج حسب طبيعة البحث المرسوم.

ولكي ندرك تماما ماذا يقصد بالتصوير الإشعاعي الذاتي يتحتم علينا التطرق إلى شرح العناصر الآتية: استعمال النظائر المشعة، تحضير الخلايا والأنسجة، إعداد فلم التصوير الحساس، مدة التعريض للإشعاع، طريقة الاظهار والتثبيت، الفحص المجهري.

استعمال النظائر المشعة

جميع النظائر المشعة (Radioactive isotopes) يجب استعمالها بحذر شديد وهناك قوانـين دولية وقوانين محلية يجب تطبيقها بشكل دقيق وحرص تام خلال استعمالها أو التخلص من بقاياها. كما يجب الحذر التام في عدم ملامستها لجسم الإنسان أو ابتلاعها مهما كانت مجففة حيث تشكل خطرا جسيما على الجسم البشري فيما لو اتحدت معه.

المـواد المـرقمـة (Labelled compounds) عادة تحضر على شكل محاليل معقمة محفـوظـة في أمبولات (Ampoules) أو قوارير زجاجية محكمة الغلق بالمطاط. كما يكتب على هذه الأمبولات أو القوارير تركيز المحلـول والنشاط النوعي (Specific activity) للعنصر المشـع. تقـاس وحـدة الإشعاع (Unit of radioactivity) بوحدة الكيورى (Curie (Ci)، حيث إن ١ كيورى يساوى $٣,٧ \times ١٠^{١٠}$ تحلل (Disntegrations) لكل

ثانية أو أن ١ ميكرو كيورى (Microcurie (Mci) يساوي ٢ , ٣×١٠⁹ تحلل في اليوم عند الحاجة إلى استخدام أي محلول مشع يجب استخدام محقنة (Syringe) مدرجة لسحب الكمية اللازمة من هذه المادة المشعة . كما يمكن تخفيف هذه المادة بمحلول ملحي متزن (Saline) أو بمحلول البيئة الغذائية قبل استخدامه في التجارب .

تعتمد طريقة استخدام المواد المشعة للترقيم أساسا على نوع التجربة وطبيعة الكائن المستخدم لهذا الغرض. عند استعمال الكائنات المائية الصغيرة مثل الطحالب والأوليات والبكتيريا وكذلك المزارع الخلوية (Cell cultures) يضاف المحلول المشع مباشرة إلى الوسط المستنبت (Culture medium) لهذه الكائنات . في حالة النبات يمكن إضافة المحلول المشع الى التربة التي ينمو فيها. أما كمية المادة المشعة وتركيز الإشعاع ومدة التعريض عادة تحدد بناء على طبيعة الكائن ونوع الدراسة .

كما يمكن حقن المحلول المشع إلى داخل جسم الكائن الحي أو تقديم مثل هذا الإشعاع مع مادة الغذاء أو الشراب وبالذات عند استخدام الحيوانات الكبيرة .

تحضير الخلايا والأنسجة

بعد تعريض الأنسجة والخلايا للمادة المشعة مدة كافية (هذه المدة تحددها طبيعة الدراسة) يتوجب تثبيت هذه الأنسجة والخلايا في أي مثبت مناسب لكن يجب الحذر عند اختيار نوع المثبت، فهناك بعض المثبتات التي تحتوي على حمض البكريك (Picric acid) أو الفورمالدهيد (Formaldehyde) تؤثر على طبقة المستحلب (Emulsion layer) التي تغطي أفلام التصوير الحساسة. لذا نجد ضرورة غسل العينات جيدا من آثار تلك المثبتات التي تؤثر على هذه الطبقة. ولعل مثبت كارنوى (والمكون من ٣ أجزاء من الكحول الأثيلي المطلق وجزء واحد من حمض الخل الثلجي) بمثابة المثبت المثالي لمثل هذه الأغراض. بعد عملية التثبيت تجرى عملية إعداد العينة للتقطيع حسب الخطوات العامة للتقطيع ، أما إذا كانت العينة على شكل خلايا معلقة فتنشر على الشرائح المجهرية بطريقة الهواء الجاف (Dry-air method). عند الرغبة في

دراسة الطبيعة الكروموسومية للخلايا يفضل استخدام ما يعرف بطريقة الهرس (Squash method). كما يفضل استخدام شرائح مغطاة بطبقة جيلاتينية رقيقة، ويعرف هذا النوع من الشرائح بالشرائح المغطاة(Subbed-slides)ويساعد هذا على التصاق فلم التصـوير الحساس وعدم تمزقة أثناء عملية التحميض. المحلول المناسب لعمل الشرائـح المغطاة يتكون من إذابة ١ جرام من الجيلاتين في لتر واحد من الماء المقطر الساخن، وبعد ذوبان الجيلاتين تماما يترك المحلول جانبا ليبرد حيث يضاف إليه ١ , ٠ جرام من كبريتـات البـوتاسيوم الكرومية (Chromium potassium sulphate) تغمس الشرائح المجهرية النظيفة في هذا المحلول لمدة نصف دقيقة، بعدها تترك في مكان جاف وخال من التيار لتجف تماما قبل الاستعمال. الجدير بالذكر أن المواد الإشعاعية غير المتحدة مع جزيئات الخلايا تغسل أثناء التثبيت وإذا دعت الحاجة للتخلص من الآثار التى عجز المثبت عن إزالتها فيستحسن أن تغسـل الشرائح في ٥٪ حمض الخل ثلاثي الكلور (Trichloracetic acid) وعند درجة حرارة ٤°م ولمدة خمس دقائق، بعد ذلك تغسل جيدا في محلول ٧٠٪ كحول أثيلي لعدة ساعات يغير خلالها المحلول ثلاث مرات.

إعداد فلم التصوير الحساس

بعد عملية تثبت الأنسجة والخلايا وتحضير الشرائح المجهرية اللازمة يأتى دور تغطية مثل تلك الأنسجة أو الخلايا بطريقة مستحلبة (Emulsion) حساسة للجسيمات التي تنـطلق من المواد المشعة المتحدة مع الأنسجة الخلوية في الوقت الحاضر، يوجد نوعان فريدان من طبقات المستحلب الحساس، إما على شكل سائل (Liquid) وتعرف باسم المستحلب السائل (Liquid emulsion) وإما عى شكل فلم رقيق جدا يطلق عليه اسم الفلم الشريطي (Stripping film).

المستحلب السائل

يوجد العديد من الشركات المصنعة والمشهورة بإنتاج مثل هذا المستحلب ولعل من أشهر المستحلبات الحساسة السائلة Kodak NTB3, Kodak NTB2, Ilford K5. هذه المستحلبات توجد على شكل مواد غروانية تذاب عند درجة حرارة ٤٢ ـ ٤٥°م، وذلك

باستخدام الحمام المائي (Water-bath) وتحت ضوء أحمر مأمون المستعمل في غرف التصوير المظلمة (Red safe light). مثل هذه المستحلبات يفضل عادة خزنها عند درجة حرارة الثلاجة العادية، ولمدة لا تزيد عن الشهرين. عند الرغبة في تغطية الشرائح التي بها القطاعات أو الخلايا المشعة، يذاب السائل المستحلب في حمام مائي عند درجة حرارة ٤٣°م ولمدة ٣٠ دقيقة، بعدها يسكب منه كمية مناسبة في وعاء صغير جدا يتناسب مع أبعاد الشريحة فقط، وهذا لغرض التوفير في كمية المستحلب. يترك مثل هذا الوعاء الصغير في الحمام المائي (٤٣°م) وتغمس الشريحة تلو الأخرى في هذا الوعاء بشكل منتظم (لمدة خمس ثوان) حتى يكون سمك الطبقة العالقة من المستحلب على الشريحة متجانس.

تترك الشرائح لتجف في الغرفة المظلمة وبمساعدة مروحة هوائية وعند درجة حرارة ٢٠°م ولمدة ٣٠ دقيقة. كما يجب التأكد التام أثناء تغطية الشرائح بالمستحلب الحساس وأثناء التجفيف من عدم تسرب الضوء إلى الغرفة المظلمة ولا يسمح إلا باستعمال النور الأحمر المأمون. بالإمكان تخفيف المستحلب بالماء المقطر إلى $\frac{1}{٤}$ أو $\frac{1}{٣}$ حسب طبيعة الدراسة لكن ينصح دائما باتباع التعليمات المرفقة مع المستحلب. كما يفضل عدم استخدام المستحلب لأكثر من مرة لتفادي مشاكل كثيرة كالتلوث. ولعل من أهم ميزات استخدام المستحلب السائل في التصوير تتركز في إمكانية الحصول على فلم رقيق جدا يلتصق بشكل مباشر مع الأنسجة الخلوية المشعة، وبذلك يكون تأثير الإشعاع عليه أكثر فعالية.

الفلم الشريطي

يوجد نوع واحد مشهور من الأفلام الشريطية تنتجه شركة كوداك ويعرف باسم (A R-10). هذا الفلم عبارة عن طبقة رقيقة جدا من مستحلب حساس منشورة على طبقة رقيقة من الجيلاتين ومحمولة على ألواح زجاجية. يمكن خزن هذا النوع من الأفلام لمدة ستة شهور عند درجة حرارة ٤°م. قبل الاستخدام تؤخذ الأفلام إلى الغرفة المظلمة وتترك لمدة ساعة كاملة حتى تأخذ درجة حرارة الغرفة (٢٠°م) ويتم العمل تحت

الضوء الأحمر المأمون رقم ٢ (Red safe light No. 2). ويجزأ الفلم إلى شرائط مستطيلة كافية لتغطية القطاع بشكل جيد بشفرة حلاقة حادة مع إدراك أن سطح الفلم الحساس إلى أعلى. يفضل عدم لمس السطح الحساس للمستحلب اطلاقا ويمسك اللوح الزجاجي في وضع رأسي ثم تقشر القطع المستطيلة بالتوالي. يجب أن تتم عملية التقشير باليد وبشكل ثابت حتى لا تتكون أية شحنات كهربائية ساكنة ويفضل استخدام ملقط رفيع لعملية النزع.

يترك الفلم يطفو (لمدة ٣ دقائق حتى ينفرد) في حمام مائي درجة حرارته ٢٠°م بشرط أن يكون سطح المستحلب للأسفل هذه المرة. بعدها تغطس الشريحة التي تحتوي على العينة المشعة بشكل مائل تحت الفلم ثم ترفع تدريجيا باتجاه الفلم حتى يتم التقاط الفلم، وبشرط أن يغطى العينة تماما. تترك الشرائح لتجف وهي في وضع رأسي بمساعدة مروحة هوائية في الغرفة المظلمة لمدة ٣٠ دقيقة.

مدة التعريض للإشعاع

بعدما تجف الشرائح المغطاة بالمستحلب السائل أو التي على شكل أفلام شريطية، توضع في صناديق مانعة للضوء (Light-tight boxes) وبشرط أن لا تلامس بعضها البعض.

كما يفضل البعض أن توضع قطعة صغيرة من مادة مجففة كمادة السليكا الغروانية (Silica gel). تغلق هذه الصناديق ويستحسن أيضا أن تشمع حواف الغطاء بشريط من الورق أو البلاستيك اللاصق ضمانا لعدم تسرب الضوء إلى الصندوق. تخزن مثل هذه الصناديق في صندوق كبير نسبيا، ويكتب عليه التاريخ والمدة اللازمة للخزن وتوضع في ثلاجة عند درجة حرارة ٤°م.

المدة اللازمة لتعريض الفلم للإشعاع، يطلق عليها اسم فترة التعريض (Exposure) ، وفترة التعريض المثالية تعتمد على عناصر عديدة ولذا يصعب تحديد

الفترة المناسبة إلا بإجراء التجارب. وبالإمكان تحميض الشرائح على فترات متفاوتة ومنها يمكن تحديد فترة التعريض المناسبة.

طريقة الإظهار والتثبيت

بعد تعريض الفلم الحساس (Exposure) للإشعاع المدة الكافية تخرج الصناديق التي تحتوي على الشرائح من الثلاجة وتوضع في الغرفة المظلمة وتترك لمدة من ٣٠ دقيقة إلى ٦٠ دقيقة حتى تأخذ درجة حرارة الغرفة (٢٠°م). أثناء تلك الفترة، يحضر محلول التحميض المظهر (Developer) المناسب، مثل مظهر كوداك (Kodak D19b) حيث يذاب مكوناته (جدول ٦ ـ ١) الواحد تلو الآخر في ماء مقطر دافي درجة حرارته تتراوح فيما بين٣٥ ـ ٤٠°م. بعد تمام الذوبان يكمل الحجم إلى لتر واحد بالماء المقطر ويترك في الغرفة المظلمة حتى يأخذ درجة حرارتها تماما. كما يجب تحضير المثبت المناسب مثل استخدام ثيوكبريتات الصوديوم (Sodium thiosulphate) وبتركيز ٣٠٪ في الماء المقطر.

جدول ٦ ـ ١ المكونات الأساسية لمحلول التحميض Kodak D19b

المـــــــــركب	الوزن بالجرام
الميتول Metol	٢,٢
كبريتيت الصوديوم Sodium sulphite	٧٢,٠
هيدروكينون Hydroquinone	٨,٨
كربونات الصوديوم Sodium carbonate	٤٨,٠
بروميد البوتاسيوم Potassium bromide	٤,٠

تحت الضوء الأحمر المأمون يوضع عدد مناسب (٣ شرائح) في جرة كوبلن (Cuplin jar) ثم يوضع في جرة أخرى حوالي ٥٠ مل من محلول الاظهار وجرة ثالثة ٥٠ مل ماء مقطر وجرة رابعة محلول المثبت. كما يفضل أن تغطى الجرة التي تحتوي على المظهر والمثبت، أما تلك التي تحتوي على الماء فتترك بدون غطاء حتى يسهل التعرف عليها في

الظلام التام. يستحسن ترتيب هذه الجرات بالقرب من الحوض بالترتيب، جرة الشرائح غير المغطاة، جرة المظهر المغطاة، جرة الماء غير المغطاة، ثم جرة المثبت المغطاة. كما يفضل أن يكون هناك ساعة توقيت بها جرس ولا تحتوي على أية مادة فلورسينية. يضبط الوقت اللازم للاظهار (٢ ـ ٥ دقائق) ثم يطفأ النور الأحمر ويحذر، ويتأكد تام يصب محلول المظهر على الشرائح وينتظر حتى يدق الجرس، بعدها يسكب المحلول في الحوض وتغسل الشرائح بالماء المقطر، ثم يسكب على الشرائح محلول المثبت، وينتظر لمدة خمس دقائق تقريبا بعدها يضاء النور. تغسل الشرائح جيدا تحت الماء الجاري المرشح لمدة عشر دقائق ثم تغمس في الماء المقطر وتترك لتجف في الهواء الخالي من الغبار.

الفحص المجهري

يمكن فحص الشرائح المغطاة بالأفلام الحساسة باستخدام مجهر الطيف المتباين بعد وضع قليل من مادة الجلسرول (Glycerol) وقبل وضع غطاء الشريحة على العينة. لكن في الغالب معظم الدراسات التي يستخدم فيها التصوير المشع الذاتي قد يتطلب الأمر صبغ الأنسجة أو الخلايا؛ إما قبل إضافة الفلم أو بعده. من الأصباغ شائعة الاستعمال في هذا المجال صبغة أزرق التلويدين (Toluidine blue) وآزر ـ ب (Azare B) أو صبغة قمزا (Geimsa Stain) لكن تعتبر صبغة أزرق التللويدين من أبسط الطرق المستعملة في صبغ الأنسجة المشعة، حيث تغمس الشرائح لبضع دقائق في محلول ٢٥, ٠٪ من الصبغة عند أس هيدروجيني حمضي (pH6). بعدها تغسل الشرائح جيدا بالماء أو ٩٥٪ كحول أثيلي لإزالة الزائد من الصبغة. تترك الشرائح لتجف تماما، ثم توضع أغطية الشرائح عليها باستخدام مادة الأيوبارال (Euparal).

عند الفحص المجهري يفضل استخدام العدسة الزيتية ذات التكبير المتوسط (X 63) بدلا من العدسات عالية التكبير (X 100) نظرا لما تمتاز به مثل هذه العدسات بعمق أبعد في التبئير. يضمن هذا رؤية جيدة لطبقة المستحلب الحساسة وما حدث بها من تغيرات بسبب الإشعاع، وكذلك ما يقع تحتها من الأنسجة والخلايا.

الباب الثاني

المجاهر الإلكترونية

- الفصل السابع : المجهر الإلكتروني النفاذ.
- الفصل الثامن: التحضيرات العامة للمجهر الإلكتروني النفاذ.
- الفصل التاسع : التثبيت والطمر.
- الفصل العاشر: التقطيع والتحميل.
- الفصل الحادى عشر: الصبغ والفحص.
- الفصل الثاني عشر: مجهر المسح الإلكتروني.

الفصل السابع

المجهر الإلكتروني النفاذ

● مقدمة ● قدرة التبيين ● مدفعة الإلكترونات ● العدسات الإلكترونية ● المجهر الإلكتروني البسيط ● المجهر الإلكتروني الحديث

مقــدمة

في نهاية القرن التاسع عشر الميلادي دخل المجهر الضوئي في المجالات العلمية المخبرية مع أن حدود قوة تكبيره قليلة.

كان العلماء في ذلك الوقت، يلجأون إلى استخدام الأشعة السينية لتحليل بعض التراكيب حسب وجودها طبيعيا في الخلية. وقد استمر ذلك لحين اقترح العالم لويس دى بروجلي (Louis de Broglie) ، ولأول مرة عام ١٩٢٤م استخدام الإلكترونات، والتي تشبه على حد قوله أشعة الضوء، في عملية فحص مكونات الخلايا.

لقد وجد العالم الألماني هانس بوش (Hans Busch) أنه يمكن للإلكترونات أن تركز في موجة رقيقة باستخدام العدسات الكهرومغناطيسية، وأنها صالحة للاستعمال في المجهر الإلكتروني إذا مرت هذه الالكترونات في وسط جيد التفريغ (الضغط أقل من ١٠ مم زئبق) إذ أن شعاع الإلكترونات يتشتت إذا ما اصطدم بأي جسم غريب من

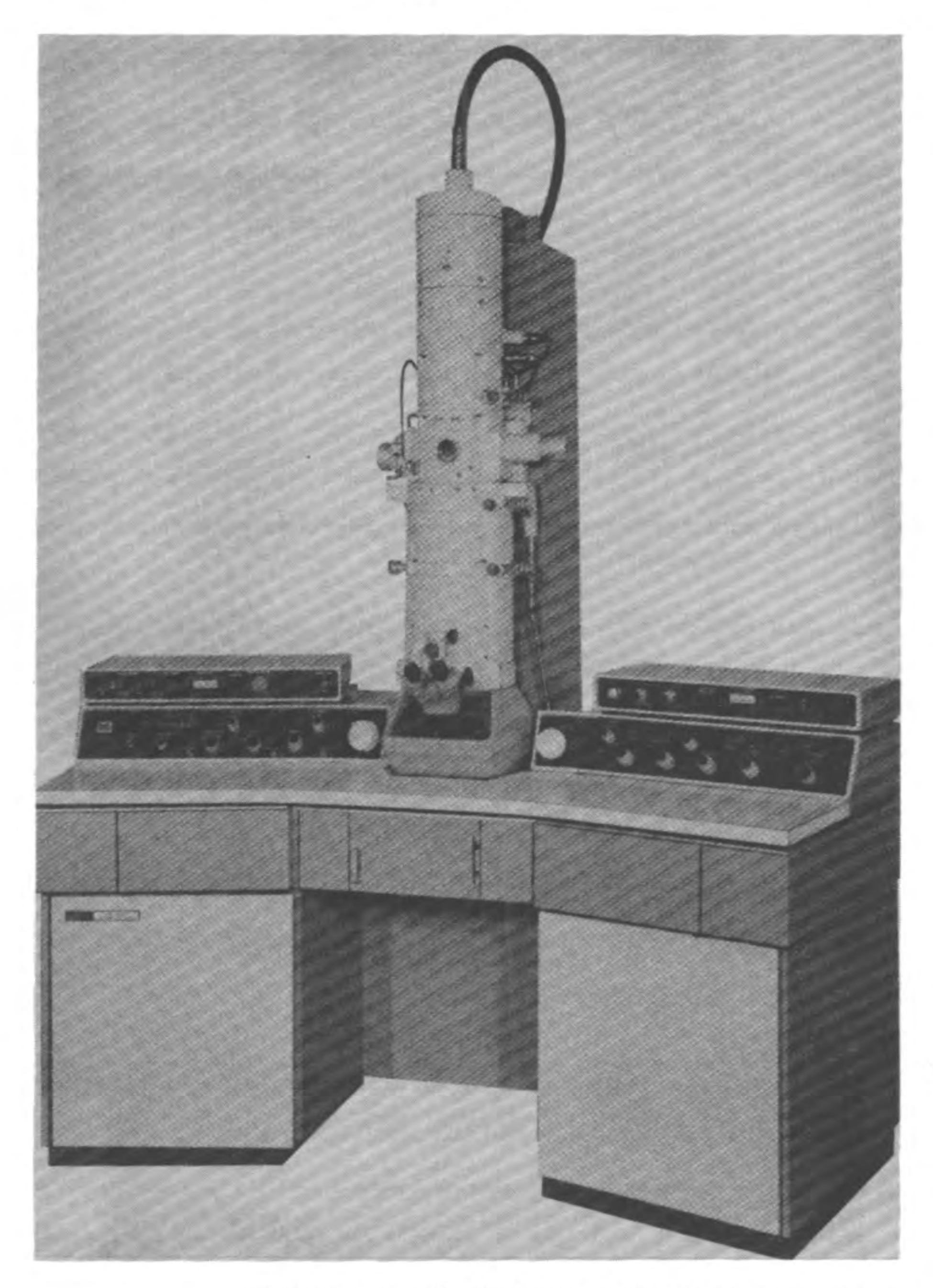
غاز وغيره، ومن هنا جاءت فكرة توصيل عمود المجهر الإلكتروني بجهاز تفريغ (Vacuum pump) عالي الفعالية.

وفي عام ١٩٣٢ نشر العالمان بروش وجوهانسن (Bruche and Johanson) وصفا لمجهر إلكتروني بوساطته أمكن رؤية الأشكال مضيئة. وكان مجهر بروش وجوهانسن لا يمتاز من ناحية قوة التبيين (Resolving power) عن مجهر ضوئي جيد الصنع.

ومع أن المجهر الإلكتروني أصبح العمل عليه ممكنا في بداية الخمسينات إلا أن استخدامه تأخر بعض الوقت في مجال الأنسجة الخلوية (البيولوجية)، يرجع ذلك لأسباب عدة، منها عدم إمكان الحصول على قطاعات رقيقة تستطيع أشعة الإلكترونات اختراقها وكذلك تأخر تطوير المجهر الإلكتروني القديم والحصول على مجاهر الكترونية نفاذة ذات قوة تبيين عالية.

وفي عام ١٩٥٣م تم تذليل بعض الصعاب الآنفة الذكر، كما أن تطوير مكونات هذا الجهاز تتقدم بخطى سريعة جداً حتى وقتنا الحالي (شكل ٧ ـ ١). وتطوير وتصحيح هذا الجهاز وطرق تحضيراته كشفت لنا النقاب عن أشياء عظيمة تعجز العين المجردة عن رؤيتها. مما نتج عنه إحداث تغيرات كبيرة في تاريخ العلوم الحيوية.

يعتبر التطور الذي حدث لعلم الأحياء في السنوات الأخيرة راجعا لأسباب منها تطور المجاهر واستعمالاتها، واكتشاف ودراسة البكتريا والأوليات، ومعرفة الخلية كوحدة بنائية أساسية للحيوان والنبات، وكذلك معرفة الكروموسومات ودورها في نقل الصفات الوراثية. والمجهر الإلكتروني الحديث كشف وأظهر خبايا التراكيب الخلوية الدقيقة أكثر من أي وقت مضى حيث غير جذريا في مفهوم تركيب ووظائف العضيات السيتوبلازمية في الخلية، كما أضاف الكثير من المعلومات الجديدة حول تركيب وتكاثر الفيروسات.



شكل ٧ ـ ١ : جهاز المجهر الإلكتروني النفاذ الحديث من نوع JEM-100 CX
(الصورة من شركة جيول)

قدرة التبيين (التمييز) Resolving power

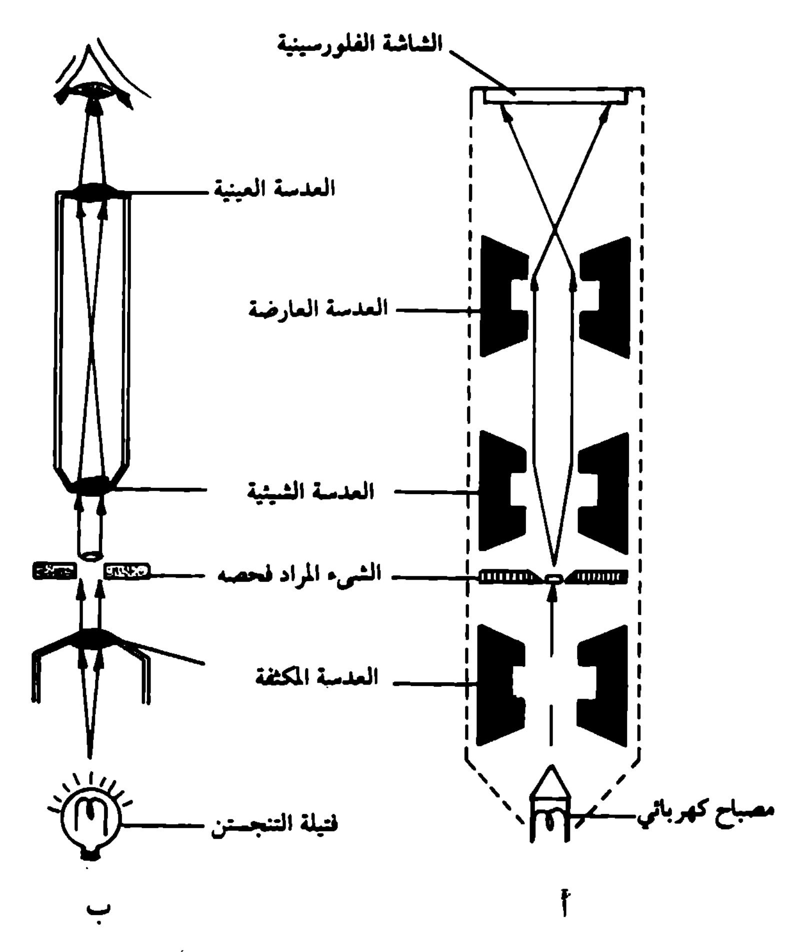
لكي نفهم الأسباب التي أدت إلى استعمال المجهر الإلكتروني وتطوره، يجب أن نتفهم بعض الشيء عن المجهر الضوئي وحدود استخداماته. وهذه تتمثل في معلومات أولية عن عدسات المجهر الضوئي وبالأخص منها ما يعنى بقدرة التبيين.

فالمجهر الضوئي المستخدم، والمعروف عادة بين غالبية الباحثين، هو المجهر الضوئي المركب العادي، وفيه يستخدم الضوء المرئي كمصدر للإضاءة. ويسمى بمجهر ضوئي عادي، لأنه يوجد العديد من المجاهر المختلفة والتي هي أيضا تستخدم الضوء المرئي ولكن عدساتها تكون أثر تعقيدا، مثل مجهر الأطوار المتباينة (Phase contrast microscope) ومجهر الاستقطاب (Polarizing microscope) وغيرها.

ويتكون المجهر الضوئي العادي من مصدر إضاءة وثلاثة أطقم من العدسات، فالعدسة المكثفة (Condenser lens) تعمل على تجميع الضوء على الشيء المفحوص، بينما تكبير الشيء المفحوص يكون عن طريقة التكاثف بين العدستين الشيئية والعينية (Objective and eye piece lens)، كما هو موضح في الشكل (٧ ـ ٢ب).

وقوة التكبير (التكبير الطولي Linear magnification) يعبر عنها بأنها النسبة بين طول الصورة وطول الجسم المفحوص، ويتراوح تكبير المجاهر الضوئية عادة ما بين ×25 و ×1500.

وحساب قدرة تكبير المجهر بسيط ولكن ذات أهمية قليلة بالنسبة لما نريد الحصول عليه من الفحص بالمجهر، فقوة التكبير مثلا (×400) تدلنا عن عدد المرات الذى كبر فيه الشيء المفحوص، ولكنها لا تعطي أية معلومات عن خصائص أخرى ألا وهي التفاصيل التي ليس لنا القدرة على ملاحظتها أو حلها بالعين المجردة. وقدرة المجهر على كشف النقاب عن التفاصيل الدقيقة جدا للجسم المفحوص هي التي تعرف بقدرة التبيين. وتعرف قدرة التبيين بأنها أصغر مسافة بين جسمين متقاربين يمكن أن تراهما



شكل ٧ ـ ٢ رسم تخطيطي يوضح مقارنة مسار الضوء في (أ) المجهر الضوئي. و(ب) المجهر الإلكتروني.

مفصولين عن بعضهما البعض. وقدرة التبيين هذه لا تحددها أنواع العدسات التي تلعب دورا في التكبير، ولكن الذي يلعب الدور الرئيسي فيها هو طول موجة الضوء المستخدم مصدرا للإضاءة، وكذلك القيمة العددية فتحة العدسة الشيئية (Numerical aperture) ، وتحسب قدرة التبيين في أبسط صورها بالمعادلة التالية:

$$\delta = \frac{0.5\,\gamma}{n \sin \alpha}$$

حيث (δ) هي قدرة التبيين، (γ) الطول الموجي، ($\propto$) نصف زاوية العدسة الشيئية، و (n) هو معامل انكسار الوسط الذي يقع بين الجسم المفحوص والعدسة الشيئية.

وتعرف ($n \sin \propto$) بقيمة الفتحة العددية للعدسة الشيئية (N.A.). وغالبا ما تستخدم وحدة الميكرومتر (μ m) لقياس الأطوال في المجهر الضوئي. والضوء المرئي طول موجته حوالي ٠,٥ ميكرومتر وقيمة الفتحة العددية لأحسن عدسة شيئية في المجهر الضوئي هي ١,٤ ، ومن هاتين القيمتين نستنتج أن قدرة التبيين للمجهر الضوئي هي حوالي ٠,٢ ميكرومتر وهذه أحسن قدرة تبيين لمجهر يستخدم فيه الضوء العادي.

مما سبق نستنتج أن الحل الوحيد لزيادة قدرة تبيين المجهر هو استخدام ضوء ذو طول موجة أقصر، فالضوء فوق البنفسجي (Ultraviolet) ذو طول موجي ٠,٣ ميكرومتر، وسوف تعطينا مجاهر الضوء فوق البنفسجي قدرة تبيين أكبر من مجاهر الضوء العادي. ولكن من مساوىء هذا الضوء أنه لا ينتقل طبيعيا من خلال زجاج العدسات أو الشرائح وأغطيتها، ولابد من استخدام مواد غالية الثمن مثل الكوارتز. وتحت أحسن الظروف تصل قدرة التبيين لمجهر الأشعة فوق البنفسجية إلى ٠,١ ميكرومتر وهذه تعتبر من أحسن قدرات التبيين التي يمكن الحصول عليها بالمجاهر الضوئية.

لهذه الأسباب مجتمعة بدأ التفكير في استخدام الإشعاع في فحص العينات، ومنها استخدام وتطوير المجاهر الإلكترونية، التي تستخدم الإلكترونات كمصدر للإضاءة. وكما سبق لوحظ أن طول موجة الضوء تقاس بالميكرومتر، ولكن طول موجات الإلكترونات أصغر منها في الضوء بكثير لذلك تقاس بوحدة النانومتر ((Nanometer (nm)) والتي هي واحد على ألف من الميكرومتر ($1/nm = 10^{-3}\mu m$). وتقاس طول موجات الإلكترونات بالمعادلة المبسطة التالية:

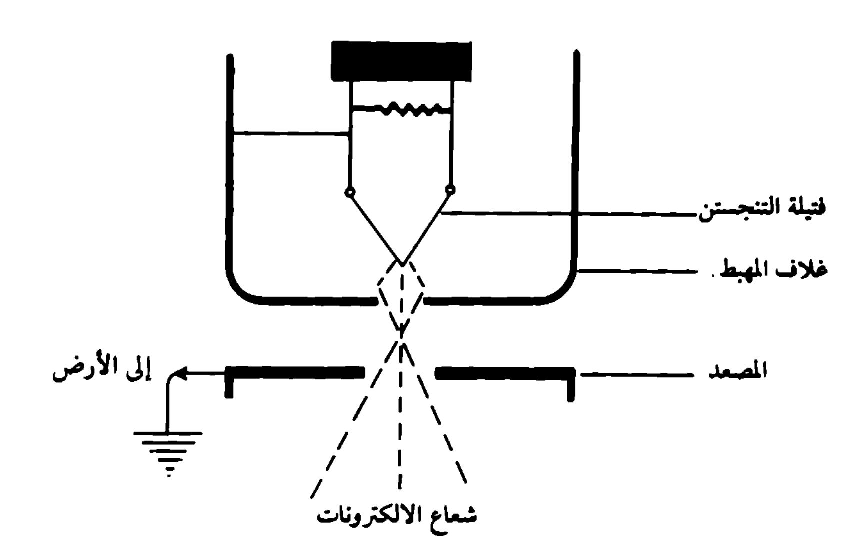
$$\delta = \sqrt{\frac{1.5}{V}}$$

حيث (δ) هي الطول الموجي للإلكترونات.

(V) هي مقدار الفولتية التي تصل إلى المجهر.

فمثلا عندما نستخدم تيار ذو فولتية ٦٠,٠٠٠ فولت فإن قيمة δ تكون ٠,٠٥ نانـومـتر. وعند مقارنة هذا الطول بقيمة طول موجة الضوء المرئي (٠,٥ ميكرومتر) يمكن ملاحظة تأثير طول موجة الإلكترونات والتي هي أقل بعشرة آلاف مرة عن طول موجة الضوء العادي وهذا الاختلاف الكبير هو الذي ينجم عنه قدرة التكبير والتبيين التي تمتاز بها المجاهر الإلكترونية والتي تفوق ما هو موجود بالمجهر الضوئي بحوالي مائتي مرة.

يطلق على مصدر الإضاءة في المجهر الإلكتروني بمدفعة الإلكترونات، وتتكون عادة من جزئين هما الفتيلة (Filament) والمصعد (Anode). والفتيلة عبارة عن سلك صغير على هيئة مخروط (V) وتعرف أحيانا بالمهبط (Cathode). أما المصعد فهو عبارة عن قطعة معدنية دائرية الشكل ويمتاز بوجود ثقب صغير في مركزه (شكل ٧ ـ ٣).



يوصل التيار الكهربائي ذو الفولتية العالية بالقطبين مما ينجم عنه تسخين الفتيلة مسببا لها إطلاق عدد هائل من الإلكترونات. وكما هو معروف عن الإلكترونات بأنها سالبة الشحنة، لذا نجدها تنجذب نحو صفيحة المصعد ذات الشحنة الكهربائية المغايرة، ومن جراء وصول هذه الإلكترونات الى صفيحة المصعد فإن مجموعة منها سوف تعبر خلال ثقب المصعد المركزي. ولضمان وصول عدد كاف من الإلكترونات إلى صفيحة المصعد غلف المهبط بصفيحة إضافية تحمل نفس شحنته السالبة مما يسهل عمليات ابتعاد الإلكترونات عن منطقة المهبط، وتعرف هذه الصفيحة بغلاف المهبط (Cathode sheild).

خاصية انبعاث الإلكترونات عند التسخين

تمتاز غالبية المعادن بخاصية انبعاث الإلكترونات عند تسخينها وتعرف هذه الخاصية بالانبعاث الأيوني الحراري (Thermionic emission). وتستخدم هذه في العديد من الأجهزة الإلكترونية الحديثة بما فيها أنبوبة أشعة المهبط (Cathode-ray tube) والمجهر الإلكتروني.

هذا وتمتاز فتيلة المجهر المصنوعة غالبا من التنجستين بزيادة عدد الإلكترونات المنبعثة بارتفاع درجة حرارة الفتيلة، حيث وجد أنه يمكن تسخينها إلى درجة ٣٠٠٠°م دون أن تنصهر. وتقوم مدفعة الإلكترونات بإنتاج شعاع ضيق من الإلكترونات، يمر بسرعة عالية في اتجاه معين. ويتراوح مقدار فولتية التيار المار خلال المهبط في المجاهر الإلكترونية ما بين ٤٠,٠٠٠ ـ ١٢٠,٠٠٠ فولت (مع العلم أنه يوجد مجاهر إلكترونية حديثة جدا تصل فيها الفولتية إلى مليون فولت). وكما سبق ذكره، فإن زيادة الفولتية تزيد من عدد الإلكترونات، ومن ثم تزداد كل من قوة التكبير وقدرة التبيين للمجهر.

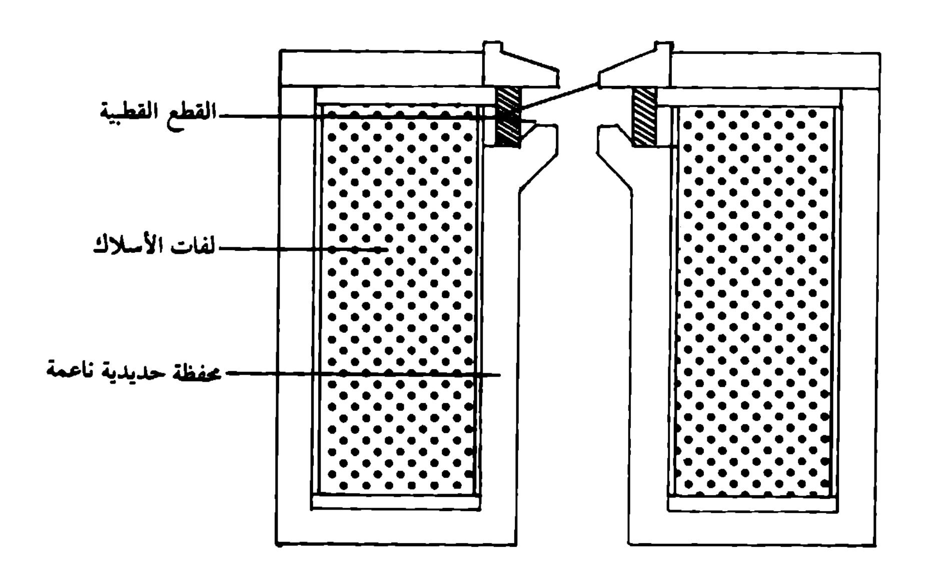
العدسات الإلكترونية Electron Lens

في مستهل هذا القرن، وجد أن مسار أشعة الإلكترونات ينحرف بوجود مجال مغناطيسي، كما هي الحال في أنبوبة أشعة المهبط. وفي عام ١٩٢٠م، عندما استخدم

المجـال المغنيطى القـطري المتشـابهة (Radially symmetrical magnetic field) الذي يمكن الحصول عليه بوساطة لفة من الأسلاك يمر خلالها تيار كهربائي والتي تعمل كعدسة يمكن بوساطتها تبئير (Focus) لشعاع (حزمة) الإلكترونات بتركيز أكبر.

العدسة الإلكترونية (شكل ٧ ـ ٤) تتكون أساسا من سلك ملفوف آلاف المرات يشبه الأنبوبة، ويمر فيه تيار كهربائي تصل قوته إلى ١ أمبير، والمجال المغنيطى الناتج من مرور التيار الكهـربائي يركز بوساطة محفظة حديدية ناعمة تحيط بهذه اللفات. ويساعد في تركيز المجال المغنيطي وجود قطع من الحديد الناعمة في مركز اللفات تعرف بالقطع القطبية (Pole pieces).

ويعتمد البعد البؤرى لهذه العدسات على قيمة التيار الكهربائي، ولذا نستطيع تغيير البعد البؤرى عن طريق التحكم في شدة التيار. والجدير بالذكر أن البعد البؤرى للعدسات الإلكترونية يصل إلى عدة ملليمترات عند التحفيز النهائي للعدسة.



المجهر الإلكتروني البسيط Simple Electron Microscope

لقد سبق وصف كل من العدسات الإلكترونية، وبندقية الإلكترونات، وهما من المكونات الأساسية للمجهر الإلكتروني. والمجهر الإلكتروني في تخطيطه العام أساسا يشبه المجهر الضوئي إلا أنه مقلوب كما في شكل (٧ ـ ٢أ).

ويوضح شكل (٧ ـ ٣) أن بندقية الإلكترونات تعمل بدل من المصباح الكهربائي في المجهر الضوئي كمصدر للإضاءة، وكذلك العدسات الإلكترونية تضاهي العدسات الزجاجية في المجهر الضوئي.

وكما هو معروف، أن العين المجردة لا تستطيع رؤية الإلكترونات، لذا يلجأ الى استقبال الصورة أو الإلكترونات على لوحة فلورسينية، أو على لوحة فوتوغرافية عند الرغبة في الحصول على صورة دائمة.

وبما أن هذه اللوحة الفلورسينية تجسم (Projects) الصورة النهائية، فإن العدسة الإلكترونية المقابلة للعدسة العينية في المجهر الضوئي تسمى بعدسة الإسقاط (Projection lens). أما العدسات الإلكترونية الأخرى فتعرف بالعدسة المكثفة (Condensing lens)، والعدسة الشيئية (Objective lens) كما هي الحال عليه في المجهر الضوئي.

كما هو معروف أن الأشعة (الحزم) الإلكترونية لا تستطيع السريان في الهواء نظرا لاصطدامها بجزيئات الغازات، لذا امتاز المجهر بوجود مجال مفرغ تماما. هذا وقد تصل قوة التفريغ داخل عمود المجهر إلى ١٠$^{-4}$ مم. زئبق. ويتم بوساطة التفريغ هذا مخلخلة هواء جيدة، إذ أن درجة التفريغ داخل عمود المجهر تختلف حسب نوع المادة المفحوصة.

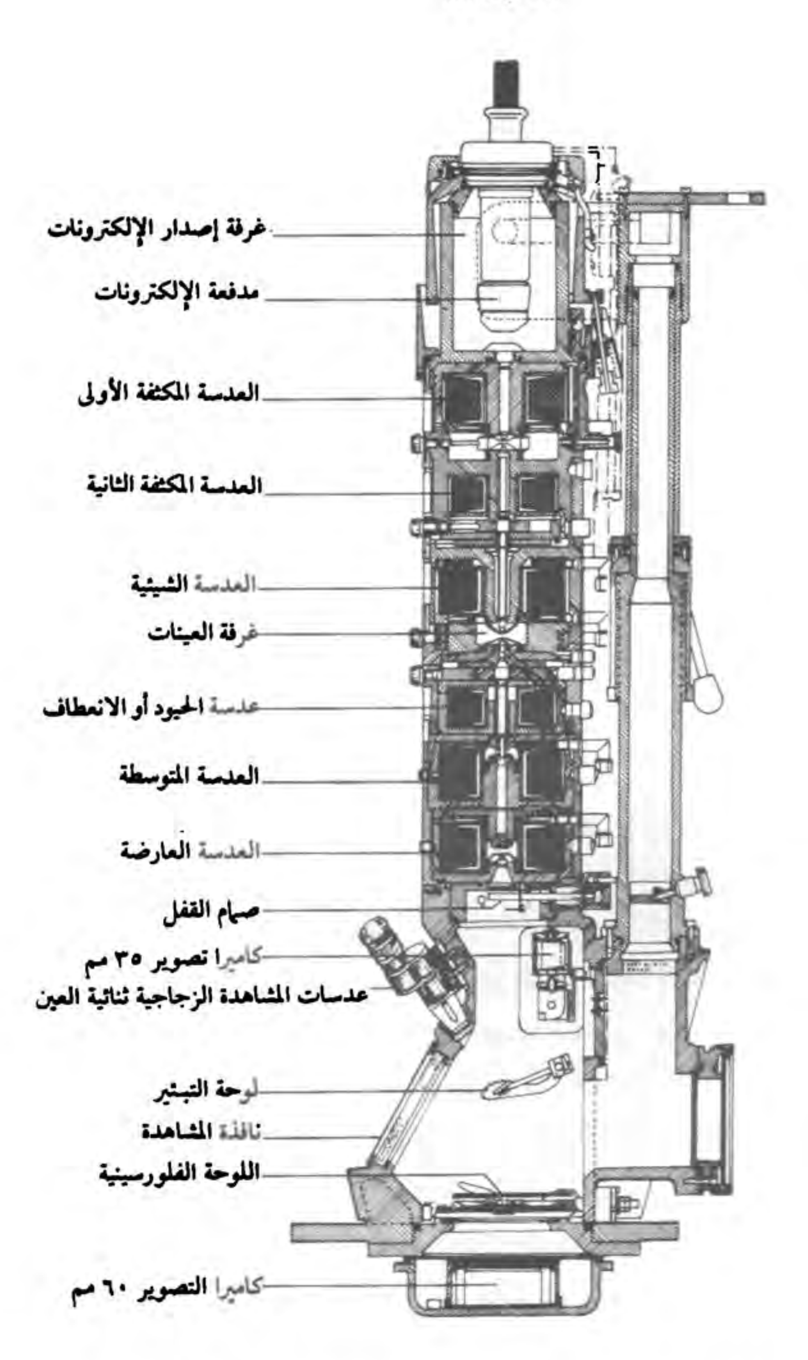
لقد بدىء في تصميم مثل هذه المجاهر الإلكترونية البسيطة في بداية الثلاثينيات

(١٩٣٠م)، ولكن هذه المجاهر كانت صعبة التشغيل، لذا أدخلت تحسينات كثيرة سواء لتسهيل التشغيل أو زيادة قدرة التبيين (Resolving power). ونتيجة لتقدم علوم التقنية والتنافس الشديد بين المصانع المتخصصة في إنتاج المجاهر، فقد أدى ذلك إلى إنتاج المجاهر الإلكترونية الحديثة.

المجهر الإلكتروني الحديث Modern E.M.

لقد سبق وصف المجهر الإلكتروني البسيط، وشكل (٧ ـ ٥) يبين التخطيط العام للمجهر الإلكتروني ذو قدرة التبيين العالية. ويختلف هذا عن الجهاز السابق وصفه في أنه مزود بعدسات إلكترونية أكثر عددا، فبدلا من عدسة مكثفة واحدة توجد عدستان مكثفتان، وبدلا من عدستين لتكوين صورة العينة، هناك أربع عدسات، كما أضيفت عدستان متوسطتان بين العدسة الشيئية وعدسة الاسقاط. فوجود عدستين مكثفتين ساعد في الحصول على شعاع (حزمة) ضيقة مركزة من الإلكترونات، والتي سوف تقلل من المساحة المتعرضة من العينة المفحوصة لهذه الحزمة من الإلكترونات، مما يقلل من إتلاف العينات. أما العدسات المتوسطة فإنها سوف تسهل من الحصول على مدى أوسع في التكبير وعادة قوة التكبير تقع في مدى واسع يتراوح ما بين ١٠٠٠× و٢٠٠٠٠٠×.

يمكن رؤية اللوحة الفلورسينية التي يظهر عليها الخيال النهائي عن طريق نافذة من الزجاج السميك توجد عند قاعدة عمود المجهر، ولعمل التبئير الدقيق (Critical focusing) فالصورة يمكن فحصها، على هذه اللوحة أو على لوحة صغيرة أخرى تبرز عند الحاجة من مركز اللوحة الفلورسينية الكبيرة بوساطة عدسات مجهرية زجاجية ثنائية العينية مثبتة خارج عمود المجهر لرؤية الصورة بوضوح أكثر. ويمكن وضع آلة التصوير أسفل هذه اللوحة التي يمكن التحكم بها آليا عند الرغبة في تصوير العينة على ألواح حساسة موجودة داخل آلة التصوير. ويجب ألا يغيب عن الذهن أن التصوير الفوتوغرافي هو الخطوة الأخيرة والأساسية في استعمال المجهر الإلكتروني، وبه يتم تحليل الملاحظات وتسجيلها من الصور المأخوذة.



شكل ٧ ـ ٥ : قطاع طولي في عمود مجهر الكتروني نفاذ عالي الوضوحية (مجهر فيلبس).

طول عمود المجهر الإلكتروني الحديث من مدفعة الإلكترونات عند القمة وحتى آلة التصوير عند القاعدة يبلغ حوالي ستة أقدام، ومن جراء مرور تيار كهربائي كبير خلال العدسات الإلكترونية سوف يؤدى إلى ارتفاع حرارتها، لذا تبرد عادة بوساطة تيار من الماء البارد.

جميع العدسات الإلكترونية ومدفعة الإلكترونات وضعت على محور واحد، ولعمل هذا أضيف إلى كل منهما محرك ميكانيكي يمكن بوساطته التحكم في وضعهما على استقامة واحدة.

كما سبق إيضاحه فإنه يجب تفريغ داخل المجهر تماما من الهواء وغيره، لذا فإن الحاجة ماسة لإضافة مضخة هواء جيدة وقوية، وكذلك مقياس دقيق لكمية الضغط. وتوجد عادة هذه المضخة خلف الطاولة التي بني عليها المجهر. هذا ولقد أضيف إلى المجاهر الحديثة جدا مضخة أيونات (Ion getting pump) لتخليص عمود المجهر من أية أيونات ربما تنتج من مركبات الهيدروكربونات وغيرها.

وللسهولة في تغيير العينات المفحوصة خلال العمل بدون الإخلال بعملية تفريغ المجهر، فلقد وضع صمام جيد بين غرفة وضع العينات وبين عمود المجهر، لكي يتمكن الفاحص من إحكام هذا الصمام، ومن ثم تبديل العينات وإدخال كمية قليلة جدا من الهواء والتي قد تكون موجودة في هذه الغرفة، ومن السهل على المجهر التخلص منها.

لقد سبق الحديث عن تأثير طول موجة الضوء أو الإلكترونات على قدرة التبيين، وإن طول موجة الإلكترونات تعتمد على كمية التيار التي تصل للمجهر، لذلك لابد من وصول كمية كافية وثابتة من التيار الكهربائي للمجهر ويتم هذا بإضافة مثبت لقوة التيار إلى المجهر مما يسهل هذه العملية سواء في حالة مدفعة الإلكترونات أو العدسات الإلكترونية. هذا بالإضافة إلى وجود مفتاح يمكن به التحكم في قيمة التيار التي تصل سواء إلى مدفعة الإلكترونات أو العدسات. وتتم جميع العمليات التي في المجهر

الضـوئي بصـورة ميكـانيكية مثل تغيير العدسات العينية والشيئية للتغيير في التكبير وعملية رفع وخفض مسرح المجهر لكي تحصل على التبئير المناسب، فإنها تتم في المجهر الإلكتروني عن طريق مفاتيح ضبط كهربائية.

الفصل الثامن

التحضيرات العامة للمجهر الإلكتروني النفاذ

● تحضير أفلام السلويدين ● تحضير أفلام الفورمفار ● تحضير أفلام الكربون

الأغشية الدعامية العامة للعينات

General Specimen Support Membranes

هناك عينات كبيرة نسبيا تحضر بطريقة القوالب (Replica) ، لا توجد فيها مشاكل تحضيرية ، أما تلك العينات الدقيقة جدا والتي تصل إلى عدة مليميكرونات في السمك مثل الجزيئات ، فإنه من الضروري ، لتحضير تلك العينات ، استخدام أغشية الدعامة للشبكات النحاسية من مواد مناسبة . وهذه الأغشية الدعامية لابد أن تكون رفيعة لتسمح بمرور شعاع الإلكترونات ، وكذلك لابد أن تكون مقاومة لمدفعة الإلكترونات ، كما أنه لابد من عدم ظهور للمواد الداخلة في صناعتها بأي نموذج مغاير عند استعمال التكبيرات العالية . ومن المواد الشائعة الاستعمال لعمل أغشية دعامية رقيقة سمكها يتراوح ما بين ٥ ـ ٢٠ مليميكرونا من مادة السلويدين (Celloidin) والفورمفار (Formvar) والكربون وغيرها .

أغشية السلويدين والفورمفار لا تفي بالأغراض المذكورة آنفا ، لأنها مواد عضوية تتحلل بوساطة مدفعة الإلكترونات ، لذا فإنه غالبا ما تغطي سطوحها بالكربون بسماكة

عدة مليميكرونات قبل الاستخدام. كما أن أغشية الفورمفار والسلويدين سهلة التحضير، ومناسبة للجزيئات المفحوصة ما عدا تلك التي يحتاج فحص عيناتها للتسخين.

تحضير أفلام السلويدين Preparation of Collodin Films

ا ـ الطريقة الرطبة Wet method

يحضر محلول السلويدين النقي جدا من وزن معين من مادة النتروسليلوز النقية، وتذاب في أي مذيب من مذيبات خلات الأميل (Amyl acetate). وغالبا ما يتراوح تركيز هذا المحلول ما بين ٥,٪ (في حالة الحصول على وضوح تام) إلى ١٪.

وتحتاج هذه الطريقة للمواد التالية:

ا ـ شبكات نحاسية Grids.

ب ـ قاعدة الشبكة النحاسية (شريحة زجاجية).

جـ ـ محلول نيوبرين التلويني (Neoprene in toluene) ويسمى شبكة بيودين الأسمنتية (Biodenmesh cement).

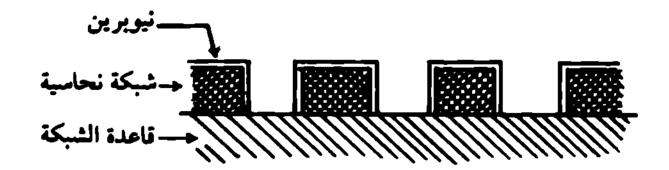
د ـ محلول السلويدين في قطارة.

هـ ـ قمع بخنر (Buchner funnel) (حوالي ١٢ سم في القطر، ملاحظة: كلما زاد قطر القمع كلما أصبح الفلم أرق).

طريقة العمل

١ ـ توضع الشبكات النحاسية واحدة بجانب الأخرى بحيث لا تتراكب على قاعدة الشبكة النحاسية، ويمكن وضع ما بين ٣٠ ـ ٥٠ شبكة نحاسية على القاعدة الواحدة.

٢ ـ يصب محلول ٢٪ نيوبرون التلويني على الشبكات النحاسية الموضوعة على القاعدة الزجاجية، وتستبعد أية زيادة من المحلول بوساطة ورقة ترشيح (شكل ٨ ـ ١).



شكل ٨ ـ ١ رسم تخطيطي يوضح تحضير نيوبرون التلوين على الشبكات النحاسية

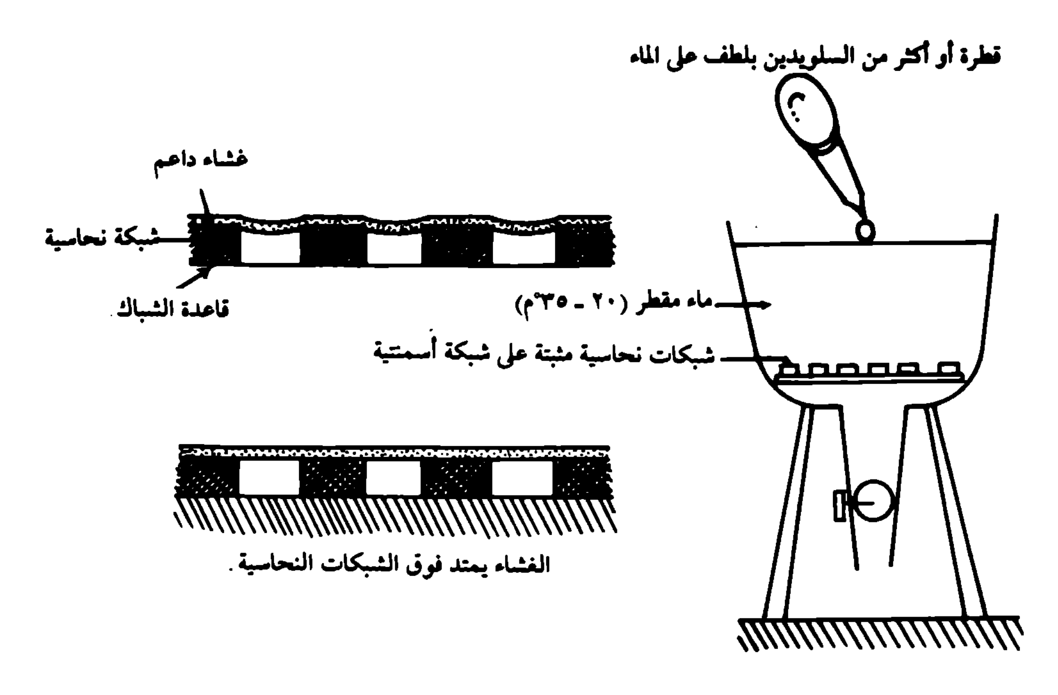
٣ ـ يملأ قمع بخنر بالماء المقطر درجة حرارته ما بين ٢٠ ـ ٣٥°م (يصبح الفلم رفيعًا عندما تكون درجة الحرارة منخفضة وسميكا عندما تكون مرتفعة) ثم تغمر فيه القاعدة الزجاجية وما عليها من شبكات نحاسية بلطف.

٤ ـ أضف قطرة من محلول السلودين بعناية على سطح الماء، عندئذ نجد أن محلول السلودين ينتشر على سطح الماء بوساطة خاصية قوة الشد السطحي أما خلات الأميل فتتبخر، ومن جراء ذلك يتكون غشاء رقيق من السلويدين. يزاح غشاء السلويدين الأول بعيدا، والغرض من وضعه هو تنظيف سطح الماء. ويجب ملاحظة أن الغشاء يتشقق عندما يكون الجو ملوث، كذلك نجد أن الغشاء يتعرج عندما يتعرض لتيار من هواء الزفير. كما يجب ملاحظة أن عمل هذا الغشاء في مكان رطب جدا قد يسبب تمزق هذا الغشاء (شكل ٨ ـ ٢).

٥ ـ أضف قطرة أخرى من محلول السلويدين، انتظر قليلا ثم أفرغ ماء قمع بخنر بلطف، ويؤدى هذا إلى تكون فلم من السلويدين فوق الشبكات النحاسية. سماكة هذا الفلم سوف تختلف حسب النسبة المئوية لمحلول السلويدين، ودرجة حرارة الماء الموجود في القمع، وأيضا قطر القمع وغيرها. فإذا استخدم مثلا سائل ٠,٥٪ سلويدين عند درجة حرارة ٢٠°م، وكان قطر القمع ١٨ سم مثلا، فإننا سوف نحصل على فلم رقيق جدا يكون صالحا للحصول على قدرة تبيين عالية.

ويمكن حساب سمك فلم السلويدين من تطبيق المعادلة التالية:

$$d = \frac{40}{\pi} \cdot \frac{n_1 S_2}{n_1 S_2 + n_2 S_1} \cdot \frac{m}{D^2}$$



شكل ٨ - ٢ : رسم تخطيطي يوضح تحضير فلم السلويدين بطريقة التنقيط.

حيث :

d : سمك فلم السلويدين

d: Thickness of colloidin film (mm).

$n_1\ n_2$: وزن السلويدين وأسيتات الأميل

$n_1\ n_2$: Weights (g) of collodin and amyl acetate solution

$s_1\ s_2$: الثقل (الوزن) النوعي للسلويدين وأستات الأميل

$s_1\ s_2$: Specific gravities of collodin and amyl acetate

m : حجم القطرة من المحلول

m: Volume of drop

D : قطر الفلم على سطح الماء

D: Film diameter (mm) on water surface

٦ - تخرج الشريحة الزجاجية وما عليها من شبكات نحاسية مغطاة وتترك لتجف أو توضع في مكان درجة حرارته ٤٥°م حتى تجف، مع الحذر من تلوثها.

٧ ـ تغطى هذه الأفلام الجافة بطبقة من الكربون يتراوح سمكها ما بين ٥ ـ ١٠ ميكرومتر باستخدام جهاز التبخير المفرغ، قبل استعمالها كأفلام تدعيم. وإذا حدث أن تشقق الفلم خلال العمليات المجهرية، فإنه يجب أن تغطى بقية الشبكات النحاسية التي لم تستخدم بطبقة من الكربون مرة أخرى لمنع التشقق.

ملاحظات

١ ـ إذا كانت درجة حرارة الغرفة عالية، فإن بخار الماء المتكون يعمل على تثقيب الفيلم لذا يحبذ أن تكون درجة حرارة الغرفة والماء المقطر المستخدم متقاربة.

٢ ـ يفضل أن يكون الماء المقطر المستخدم في خطوات تحضير الفيلم نقيا جدا خاليًا من الأيونات.

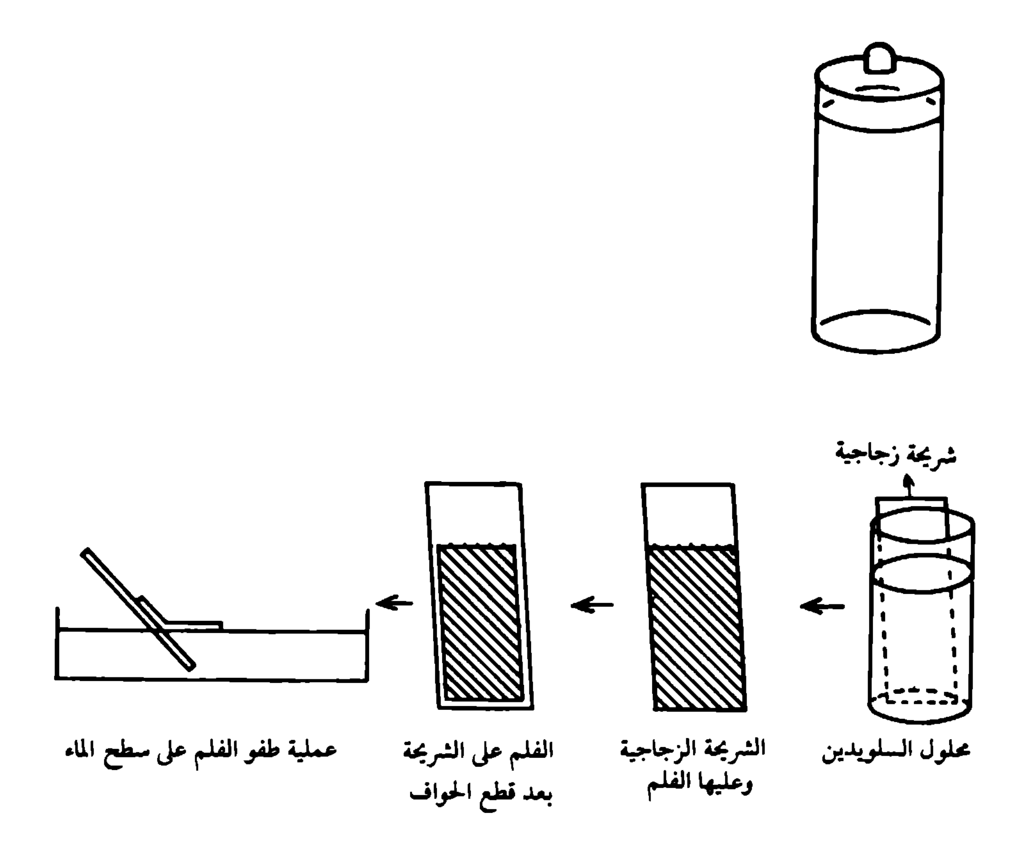
ب ـ طرق التجفيف Dry methods

هناك عدة طرق لإعداد الأفلام بطرق التجفيف ومن أهمها:

١ ـ طريقة الغمر Immersion method

تملأ أنبوبة زجاجية ذات فوهة واسعة بمحلول ١,٠ ـ ٥,٠٪ سيلويدين. تغمر شريحة زجاجية نظيفة جدا رأسيا في هذا المحلول، ثم تسحب من المحلول بلطف، سوف يصبح جانبي الشريحة الزجاجية مغطيان بالسلويدين. اقطع عند حواف الشريحة بمساعدة شفرة حادة، ثم اغمر هذه الشريحة بوضع مائل (زاوية ٣٠°) في طبق بترى يحتوى على ماء مقطر، وعندها سوف يطفو الفلم من على الشريحة ويصبح عائما على سطح الماء (شكل ٨ ـ ٣).

أحيانا يكون الفيلم رقيقا تصعب رؤيته بالعين المجردة، لذا يفضل وضع مصدر إضاءة بالقرب من الفلم لكي ينعكس الضوء ومن ثم تسهل رؤيته. أما إذا كان الفلم رقيق جدا فإنه من الضروري تحضير محلول ١٪ بيودين ((Bioden R.F.C. (TAC)) وهو مكون من ٩٠ مل الإيثان ثنائي الكلوريد (Dichloroethane) و١٠ مل كحول مثيلي و١جم من (TAC)، وإذا أضيف هذا المحلول إلى حواف الفلم فإنه يصبح من السهولة ؤيته طافيا على سطح الماء.



شكل ٨ ـ ٣ : طريقة تحضير فلم السلويدين باستعمال طريقة الغمر.

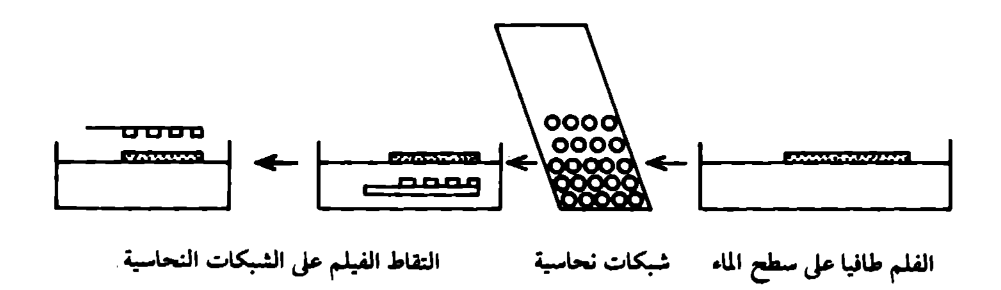
تتم عملية تحميل فلم السلويدين على الشبكات النحاسية باتباع الخطوات التالية :

ا ـ تدهن الشبكات النحاسية بمادة أسمنتية لاصقة (٢ , ٠٪ النيروبيرين التكويني ويعرف هذا اسمنت بيودين للشبكات النحاسية).

ب ـ ترتب الشبكات على مقدمة الشريحة الزجاجية ويتخلص من الزائد من المادة اللاصقة بمساعدة ورقة ترشيح. وفي حالة أي تراكب للشبكات النحاسية، يعاد ترتيبها قبل جفاف المادة الأسمنتية اللاصقة، ثم تجفف هذه الشبكات عند درجة حرارة الغرفة. هناك طريقتان لتحميل الفلم على الشبكات النحاسية إحداهما طريقة غرف

الفلم على الشريحة، والأخرى بوساطة وضع الشريحة الزجاجية بما فيها من شبكات نحاسية على الفلم (شكل ٨ ـ ٤).

جـ ـ بعد التصاق الفلم على الشبكات النحاسية، تترك تجف جيدا ثم تغطى بالكربون بمساعدة جهاز التبخير المفرغ قبل استعمالها في عمليات المجهر.



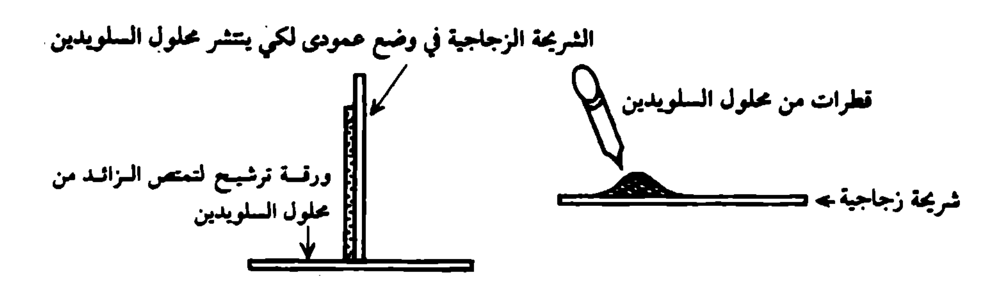
شكل ٨ ـ ٤ : رسم تخطيطي يوضح عملية تحميل فلم السلويدين على الشبكات النحاسية.

٢ ـ *طريقة التنقيط* ***Celloidin dropping method***

ضع عدة نقاط بقطارة من محلول ١, ٠ ـ ٥, ٠٪ سلويدين على شريحة زجاجية نظيفة في وضع أفقي. عدل الشريحة من وضعها الأفقي إلى الوضع الرأسي بعدما ينتشر المحلول على الشريحة، بحيث يكون أسفلها ورقة ترشيح لتمتص الزيادة من المحلول، واتركها مدة حتى يجف المحلول وينتج عن ذلك تكون فلم السلويدين على الشريحة (شكل ٨ ـ ٥). اقطع بمساعدة شفرة حادة عند حواف الشريحة ثم اكمل نفس الخطوات الآنف ذكرها في طريقة الغمر.

تحضير أفلام الفورمفار بطريقة التجفيف
"Dry" Preparation of formvar films

يمتاز فلم الفورمفار بأنه أكثر قوة ومقاومة للإلكترونات إذا ما قورن بفلم



شكل ٨ ـ ٥ : تحضير فلم السلويدين بطريقة التنقيط.

السلويدين، ويعمل فلم الفورمفار عادة بطريقة التجفيف، وذلك بأخذ ٠,٠٥ ـ ٠,٥٪ منه والمذاب في كلوريد الايثلين أو الكلوروفورم.

يحضر الفلم بإحدى الطرق السابق ذكرها في تحضير فلم السلويدين الجاف، ومما هو جدير بالملاحظة أن الفورمفار يذاب في محاليل سريعة التطاير، لذا يجب أن تكون طريقة التحضير بسرعة أكثر منها في حالة السلويدين. ويلاحظ أيضا تثقب الفلم عندما يحضر في جو رطب.

تحضير أفلام الكربون Preparation of Carbon Films

تحضر أفلام الكربون بوضع ٥٠ أنجستروم (A°) إلى ٢٠٠ مم من الكربون المبخر على طبقة من قطعة بلورية نظيفة، أو شرائح الميكا باستعمال جهاز التبخير المفرغ. يعزل الفلم من على شريحة الميكا أو البلورة، ومن ثم تغرف الأفلام على الشبكات النحاسية بنفس الطريقة الآنف ذكرها في طرق تحضير أفلام السلويدين.

من مميزات الفلم الكربوني مقاومته للحرارة وثباته كيميائيا، حتى ولو كان رقيقا جدا، فإنه سوف يكون فيلما مدعما جيدا بسبب مقاومته العالية للإلكترونات، وهو أيضا أقل تلوثا من أفلام السلويدين والفورمفار.

الشبكات Grids

بعد سرد بعض طرق تحضير الأفلام لشبكات المجهر الإلكتروني، فإنه من الأولى إعطاء نبذة مختصرة عن أنواع الشبكات المستخدمة. توجد عادة عدة أشكال للشبكات على حسب الاستعمال المجهري وكذلك على طبيعة العينة. وغالبا ما تكون تلك الشبكات مصنوعة من النحاس وأحيانا مصنوعة من الموليبدينوم أو البلاتين عندما يكون يلزم تسخين العينة المفحوصة أو معاملتها بمواد كيميائية. ومن أنواع الشبكات ما يلي (شكل ٨ ـ ٦):

أ ـ *الشبكة ذات ١٠٠ أو ١٥٠ فتحة غير المنتظمة:* هذا النوع من الشبكات يصل قطر ثقوبها الى ١٠٠ ميكرومتر وفتحاتها غير منتظمة. يفضل استعمال الشبكة ذات المائة ثقب لفحص العينات الكبيرة عندما يراد تصويرها (شكل ٨ ـ ٦أ).

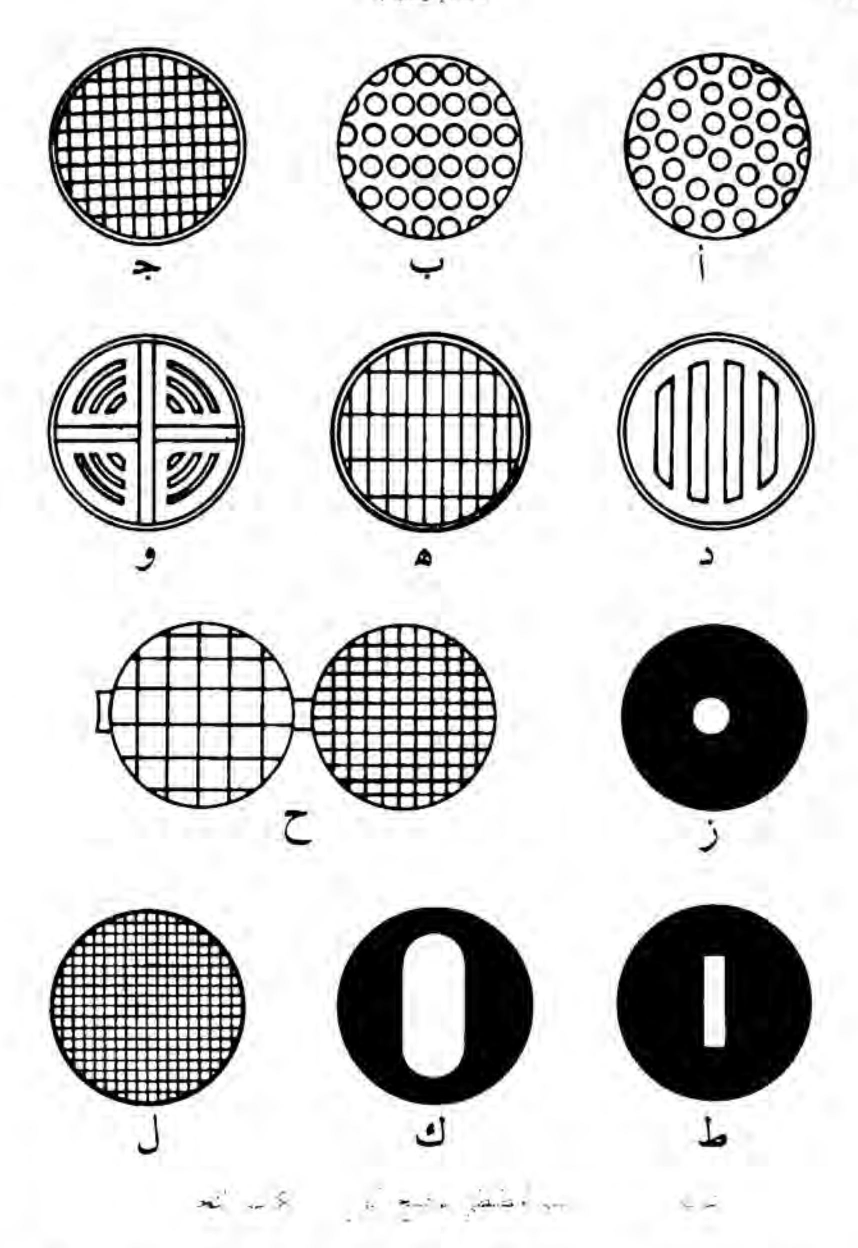
ب ـ *الشبكات ذات ١٠٠ أو ١٥٠ فتحة منتظمة:* يمتاز هذا النوع من الشبكات بانتظام توزيع ثوبها ويسهل هذا عمليات فحص العينة والحصول على حقل أكبر مما في النوع السابق (شكل ٨ ـ ٦ب).

جـ ـ *شبكات ذات ١٠٠ أو ١٥٠ أو ٢٠٠ ثقب:* وهذه تعرف بالشبكة مربعة الثقوب وغالبا ما تستخدم في حالة دراسة العينات البيولوجية وهي مناسبة للفحص لما تمتاز به من مدى واسع في مجال الفحص (شكل ٨ ـ ٦جـ).

د ـ *الشبكة ذات الشقوق القليلة:* هذا النوع من الشبكات عادة يستخدم في فحص العينات البيولوجية الطويلة نسبيا مثل الألياف. ويحبذ الحذر الشديد من تمزق الأفلام عند استخدام هذا النوع من الشبكات نظرا لطول شقوقها نسبيا (شكل ٨ ـ ٦ د).

هـ ـ *الشبكات ذات الشقوق العديدة:* تمتاز هذه الشبكات بعدم تأثر الفلم كثيرا بسبب صغر عرض شقوقها عند مقارنتها بالنوع السابق في (د) (شكل ٨ ـ ٦هـ، و).

و ـ *الشبكة وحيدة الثقب:* يستعمل هذا النوع في العينات المحضرة بطريقة القوالب (Replica) (شكل ٨ ـ ٦ ز، ط، ك).



هذا ويحبذ استخدام الأفلام الدعامية في المجموعة السالف وصفها من الشبكات مع العلم أنه توجد شبكات ذات ثقوب صغيرة يتراوح عدد ثقوبها ما بين ٣٠٠ - ٤٠٠ ثقب، شكل (٨ - ٦ل) وشبكات تشبه الشطيرة (السندوتش) (شكل ٨ - ٦ح).

التثبيت والطمر

■ التـثـبـيت ● خطوات التثبيت
● أهم المثبتات ● المحاليل المنظمة
■ التجفيف والطمر
● أنواع مواد الطمر

أولا : التثبيت : Fixation

الغرض الأساسي من عملية التثبيت هو حفظ التفاصيل التركيبية الخلوية في حالة مشـابهـة لما كانت عليه قبـل عزل العينة من الكائن الحي . ويعني هذا تحويل المواد الـبروتينية الـذائبـة إلى مواد متخثرة مما يحد من عملية التحلل البكتيرى والذاتي مع المحـافظة على طبيعة العضيات الخلوية وإكساب العينة قدرا من الصلابة تمكنها من تحمل عمليات التجفيف والطمر التي تعقب عملية التثبيت.

خطوات التثبيت

هناك بعض الإجراءات الواجب اتباعها أثناء تثبيت عينات المجاهر الإلكترونية النفاذة للحصول على نتائج جيدة، والتي يتحتم التطرق لها بشيء من التفصيل مثل: الحصول على العينة، نفاذية المثبت، الضغط الأزموزى والرقم الهيدروجيني للمثبت، درجة حرارة التثبيت وتركيز المثبت.

الحصول على العينة

عند الرغبة في الحصول على عينة من الكائن الحيواني، يستحسن عدم الازعاج حتى لا يختل مستوى النظام الإفرازي عن الحد الطبيعي. كما يفضل قدر المستطاع، عدم استعمال المخدرات لقتل الحيوان لما قد تسببه من تغيرات في بعض المكونات الخلوية وخاصة الخلايا العصبية. كما يجب ألا يغيب عن الذهن السرعة في عزل الجزء المراد تثبيته نظرا لأن موت الخلايا ينجم عنه هضم الإنزيمات المحللة للخلايا ذاتها، ومثل هذه التغيرات يصعب ملاحظتها على مستوى المجهر الضوئي، ولكن يمكن ملاحظة ذلك بالمجهر الإلكتروني. أما في حالة الكائنات الحية مثل الحشرات والطفيليات الصغيرة فعادة تشرح في محلول المثبت أثناء عزل الجزء المراد دراسته.

نفاذية المثبت

نظرا لأن أحد الأغراض الرئيسية من عملية التثبيت هو سرعة إيقاف التفاعلات الكيميائية الحيوية، لذا يجب أن يتميز المثبت بسرعة النفاذ إلى داخل أنسجة العينة. وكما هو معروف أن بعض المثبتات بطيئة النفاذ مثل رابع أكسيد الأوزميوم، لذلك يفضل تقطيع العينات إلى مكعبات صغيرة لا يزيد سمكها عن ٢ مم لتسهيل سرعة نفاذ المثبت. الجدير بالذكر، أن العينات الكبيرة عادة يتم تثبيت الأجزاء السطحية منها ويتعذر نفاذ المثبت إلى أعماقها حتى ولو كان المثبت سريع النفاذية.

الضغط الأسموزي والأس الهيدروجيني للمثبت

يجب أن يكون الضغط الأسموزى للمثبت مشابها للضغط الأسموزى للعينة المراد دراستها خوفا من حدوث تغيرات شكلية للتراكيب الدقيقة للعينة قد ينجم عن خروج أو دخول بعض السوائل. ومن المعروف أن الاختلاف في الضغط الأسموزى بين محلول المثبت والمحاليل السيتوبلازمية يحدث عنه تغيرات تخريبية لعضيات الخلية، لذا يفضل أن يحتوي المثبت على ملح متعادل (Neutral salt) أو مادة خاملة (Inert substance) تعمل على جعل الوسط متزن (Isotonic). كذلك الاختلاف في

الأس الهيدروجيني ربما يتسبب في تحرر أيونات الهيدروجين، لذا يفضل إضافة أحد المحاليل المنظمة (Buffer) لكي تقلل من تحرر أيونات الهيدروجين.

درجة الحرارة ومدة التثبيت

تلعب درجة حرارة المثبت دورا هاما في سرعة التثبيت، فالمعروف أن درجات الحرارة تزيد من سرعة التفاعلات الكيميائية بين المثبت ومكونات الخلية، بما في ذلك الإنزيمات، كما تزيد في سرعة نفاذ المثبت إلى أعماق النسيج. وتجدر الإشارة إلى أن التثبيت لمدة طويلة عند درجة حرارة عالية تسبب في فصل بعض من مكونات الخلية. أما درجات الحَرارة المنخفضة فإنها تزيل استقطاب الأغشية البلازمية وتزيد من مقاومة هذا الغشاء لنفاذ الأيونات.

أما مدة التثبيت لمعظم الأنسجة غير معروفة، وغالبا ما توضع المواد المراد تثبيتها لمدة تتراوح ما بين ساعة عند درجة حرارة الغرفة إلى أربع ساعات عند ٤°م. كما يحدد زمن التثبيت نوع المثبت المستخدم، حجم العينة، نوع العينة، نوع المحلول المنظم المستخدم، وكذلك نوع الصبغة التي سوف تستعمل فيما بعد. ويلاحظ أن مدة التثبيت في رابع أكسيد الأوزميوم أكثر حرجا منها في حالة مثبت الجلوترالدهيد، نظرا لأن الأول لا يرتبط مع كثير من المواد البروتينية، لذا نجد أنها تنفصل عن الخلايا.

تركيز المثبت

يحدد تركيز المثبت حسب نوع الدراسة وطبيعة العينة، فمن المعروف أن العينة تحتاج إلى مدة أطول عندما يكون تركيز المثبت منخفض لكن هذا قد يتسبب في انتشار بعض الإنزيمات، وانفصال بعض مكونات الخلية، وأحيانا أخرى قد يؤدى إلى انتفاخ أو انكماش الأنسجة. أما التراكيز العالية للمثبت فليست مرغوبة لما تنتج عنها من تكسير لبعض الإنزيمات أو عضيات الخلية الدقيقة.

أهم المثبتات

وفيما يلي سوف نتحدث عن أهم المثبتات المستعملة في مجال المجهر الالكتروني.

رابع أكسيد الأوزميوم Osmium Tetroxide

لقد عرف عن رابع أكسيد الأوزميوم بأنه يتفاعل مع الروابط الثنائية في الدهون. ويظن أنه يربط الجزيئات المتجاورة مع بعضها البعض، كما في المعادلة التالية:

$$2\ \begin{matrix} | \\ CH \\ \| \\ CH \\ | \end{matrix} + 2\,OsO_4 \rightarrow \begin{matrix} | \\ CH-O \\ | \\ CH-O \\ | \end{matrix} \overset{O}{\underset{}{Os}} \begin{matrix} | \\ O-CH \\ | \\ O-CH \\ | \end{matrix} + OsO_3$$

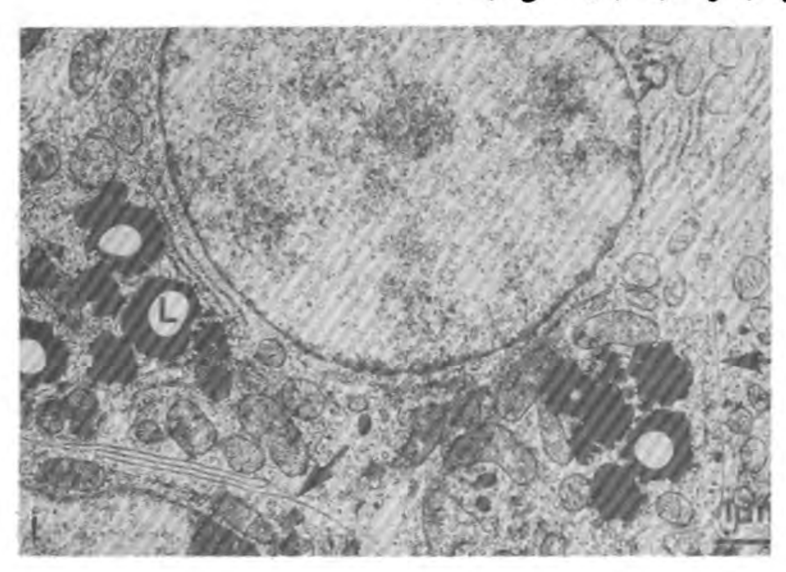
كما يتفاعل رابع أكسيد الأوزميوم مع المجاميع القطبية للدهون بعد تفاعله الأولي آنف الذكر.

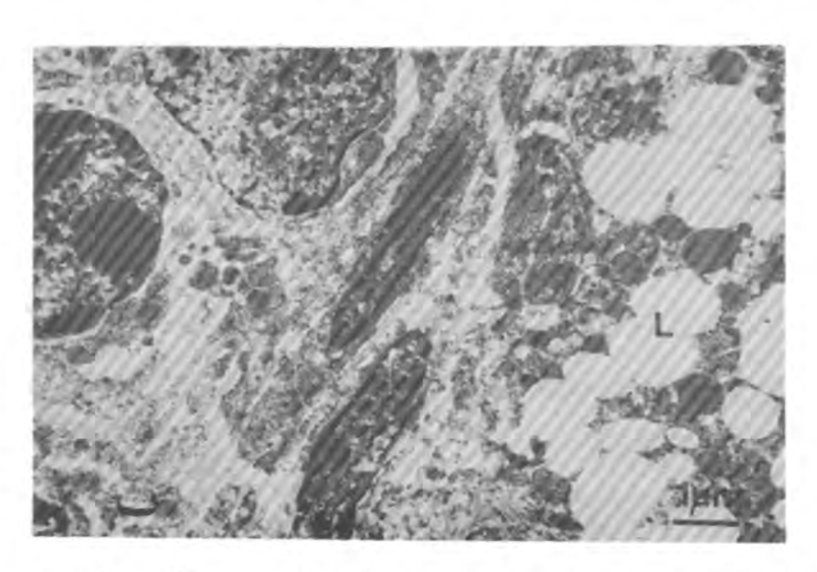
تفاصيل تفاعل رابع أكسيد الأوزميوم مع البروتينات ما زال غير مؤكد، رغم الاعتقاد أنه يرتبط مع المجاميع في البروتينات مثل: SS و SH بينما لا يتفاعل رابع أكسيد الأوزميوم مع كل من الحموض النووية والمواد السكرية (الكربوهيدراتية) شكل (٩ - ١أ، ٢أ).

ويجب أن لا يغيب عن الذهن أن محلول رابع أكسيد الأوزميوم سريع التطاير (Volatile) وأبخرته شديدة وبالغة السمومية. ونظرا لأنه يعتبر من المثبتات الممتازة إلا أن أبخرته تقتل الخلايا الطلائية بمجرد مرورها عليها أو تلامسها. كما يتسبب في تحطيم الخلايا الطلائية لقرنية العين والخلايا الطلائية المخاطية للمجارى التنفسية والفم، وينتج عن هذا مثلا أن أبخرته إذا لامست طلائية العين فسوف تموت خلاياها وتنسلخ لعدة أيام مما يعيق عملية الإبصار.

يفضل عند حمل رابع أكسيد الأوزميوم، سواء كان مادة صلبة أو محلولا، استعمال قفازات بلاستيكية أو مطاطية. وكذلك يجب أن تتم عمليات التثبيت في خزانة الأبخرة

(Fume cupboard) ذات نافذة زجاجية ومزودة بمروحة الشفط (Extractor fan) المناسبة لسحب أبخرة المثبت بعيدا عن الباحث.





شكل ٩ ـ ١ : ا ـ صورة من نسيج الأستيرويدات المبيضية المثبت برابع أكسيد الأوزميوم.
ب ـ صورة من نسيج الأستيرويدات المبيضية المثبت بالجلوتر الدهيد فقط.

(عن B. S. Weakley, 1981)

وفي حالة تعذر وجود مثل تلك الخزانة، فإنه لابد وأن تزود الغرفة التي تتم فيها عمليات التثبيت برابع أكسيد الأزميوم بمروحة شفط على الأقل، كما يجب ألا يكون الباحث في طريق تيار الهواء الذي يمر باتجاه المروحة حتى لا يصاب بأذى من أبخرة الأوزميوم.

المثبتات التي تحتوي على الألدهيدات Fixatives Containing Aldehyde

محلول الفورمالدهيد هو أحد المثبتات الشائع استخدامها في مجال المجهر الضوئي، ولكنه غير مرغوب الاستخدام في مجال تثبيتات المجاهر الإلكترونية. ولكن الدراسات الكثيرة التي قام بها العالم سباتاني وزملائه عام ١٩٦٣ (Sabatini, Bensch, Barrnett; 1963) آتت ثمارها بخصوص الألدهيدات، وبخاصة محلول الجلوترألدهيد. ولقد أثبتت الدراسات أن استعمال مثل هذا المثبت أفضل من استعمال مثبت رابع أكسيد الأوزميوم بمفرده، لما له من قدرة تثبيتية أعم تعطي في النهاية نتائج جيدة. والجدير بالذكر أن استعمال خليط حديث التحضير من مثبتى الفورمالدهيد والجلوترألدهيد يعتبران بمثابة مثبت جيد وسريع النفاذية يناسب معظم الأنسجة الحيوية. ولقد وجد أن خلط مثبت الأكرولين (Acrolein) مع مثبت الجلوترألدهيد يعطي نتائج مناسبة في دراسات معينة مثل دراسة الأنيبوبات الدقيقة جدا في الخلايا (Cytoplasmic microtubules).

لكن يعتبر الجلوترألدهيد من أشهر المثبتات شائعة الاستعمال في مجال تثبيت عينات المجاهر الإلكترونية، لذا يجب إعطاء فكرة موجزة عن هذا المثبت:

الجلوترألدهيد: Gultaraldehyde (Gultaric acid dialdehyde)

$$OHC-CH_2-CH_2-CH_2-CHO$$

الجلوترألدهيد مركب عضوي بسيط، تتكون سلسلته من خمس ذرات كربون تحمل مجموعتي ألدهيد. وزنه الجزيئى ١٢ , ١٠٠ ويمتاز بلزوجة منخفضة. وضغطه البخاري (Vapor pressure) ١٧ مم زئبق عند درجة ٢٠°م. ويعتبر قليل السمية نسبيا، كما أنه لا يؤثر على لمعان المعادن الفولاذية التي لا تصدأ (Stainless steel). وعادة

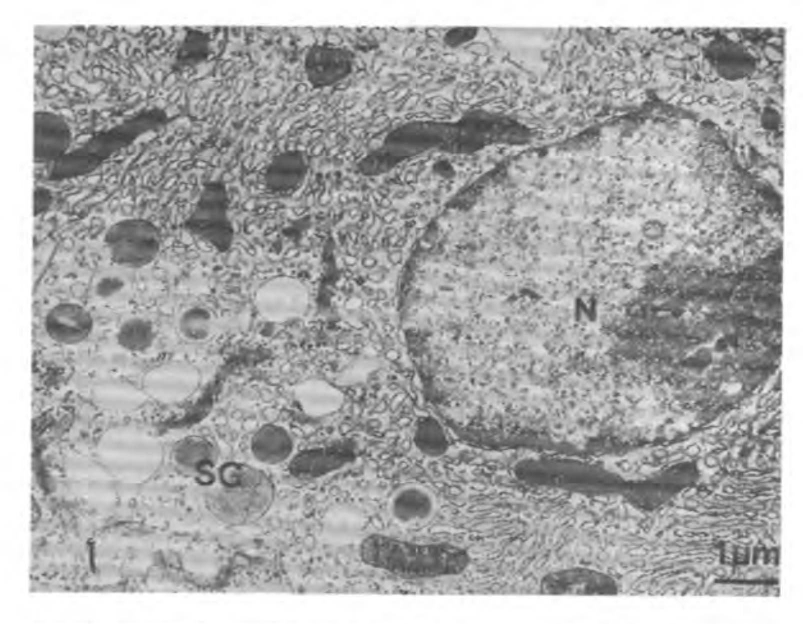
يحضر على هيئة محلول تركيزه ٢٥٪ في الماء. وهذا المحلول قليل الثبات عند درجة حرارة الغرفة مما يستدعى حفظه في ثلاجة.

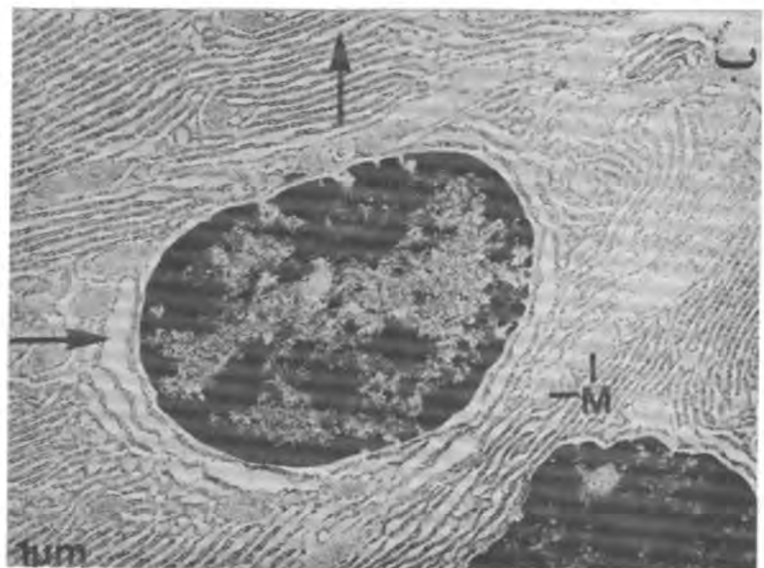
كما أثبتت الدراسات التي قام بها سباتيني وزملائه عام (١٩٦٢، ١٩٦٣، ١٩٦٤) وبارنت وزملاؤه عام ١٩٦٤ (Sabatini et al. 1962, 63, 64/ Barrnett et al. 1964). أن مثبت الجلوترألدهيد أنسب مثبتات الألدهيدات التي استعملت حتى الآن من حيث الفعالية والاحتفاظ بالتراكيب الدقيقة للنسيج المثبت. هذا ويمكن ترك العينات النسيجية في هذا المثبت لعدة ساعات دون أن يؤثر عليها، ولذا يعتبر هذا المثبت في وقتنا الحاضر من أفضل وأكفأ المثبتات التي يمكن حفظ العينات البيولوجية للدراسات الروتينية في مجال المجهر الإلكتروني (شكل ٩ - ١ب، ٢ب). رغم أنه يستعمل أغراض عدة منها تثبيت عينات المجاهر الإلكترونية في الدراسات المناعية وكذلك للتعقيم (Sterilization & disinfection). بالإضافة إلى أنه يستعمل كمثبت جيد في حالة العينات البرافينية للمجاهر الضوئية. ويعتبر الجلوترألدهيد مثبتا ممتازا عند عزل العضيات الخلوية بوساطة آلة الطرد المركزي الفائقة السرعة (Ultracentrifugal analysis).

ويعتبر الجلوترألدهيد أقل تطايرا من رابع أكسيد الأوزميوم، ولكن يجب الحذر عند استخدامه وعدم استنشاق أبخرته. ويفضل أن تتم عمليات التحضير والتثبيت في معمل جيد التهوية.

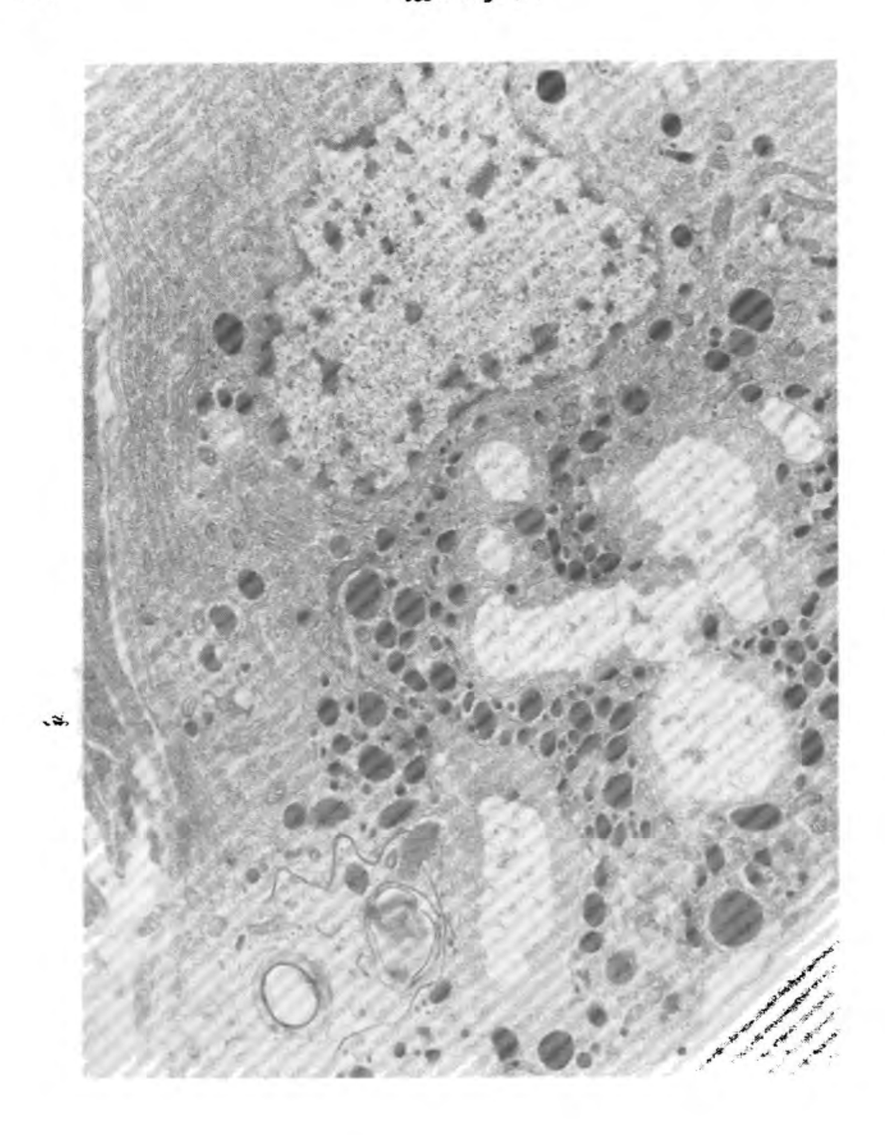
التثبيت المضاعف **Double Fixation**

في الوقت الحاضر، نادرا ما يستعمل رابع أكسيد الأوزميوم كمثبت أولي لعدم قدرته على تثبيت كثير من مكونات الخلية السيتوبلازمية. وتعتبر أحسن الطرق الشائعة لحفظ الأنسجة في وقتنا الحاضر هي عملية التثبيت المضاعف (Double fixation). بمعنى آخر التثبيت أوليا في الجلوترألدهيد، ثم التثبيت في محلول رابع أكسيد الأوزميوم. وهذه الطريقة تجمع بين محاسن كلا المثبتين، لذا نجد أن محلول رابع أكسيد الأوزميوم يثبت الدهون المتعادلة والدهون الفسفورية، بينما محلول الجلوترألدهيد يمتاز بتثبيت بروتينات الخلية بشكل عام (شكل ٩ - ٣).





شكل ٩ ـ ٢ : ا ـ خلايا الجيوب البنكرياسية المثبتة في رابع أكسيد الاوزميوم والقطاعات الرقيقة مصبوغة بخلات اليورانيل المتبوعة بصبغة سترات الرصاص.
ب ـ خلايا الجيوب البنكرياسية المثبتة بالجلوترالدهيد. والقطاعات الرقيقة مصبوغة بخلات اليورانيل المتبوعة بصبغة سترات الرصاص. (عن B. S. Weakley, 1981)



شكل ٩ ـ ٣: خلايا من غدة الكيس المنوي في الحشرات، مثبتة بالجلوتر الدهيد، ثم رابع أكسيد الأوزميوم والقطاعات الرقيقة مصبوغة بخلات اليورانيل ثم سترات الرصاص.

البرمنجنات ***Permanganate***

مثبتـات البرمنجنات تكون على هيئة برمنجنات البوتاسيوم، والتي كانت شائعة الاستعمال في بداية عهد المجهر الإلكتروني وبخاصة في تثبيت الأنسجة النباتية وبنسبة أقـل مع الأنسجـة الحيوانية. أمـا في الوقت الحاضر فلقد استبدلت تقريبا بمثبتات الجلوترألدهيد والأوزميوم.

وكما هو معروف فإن البرمنجنات مادة مؤكسدة تشبه في ذلك رابع أكسيد الأوزميوم ولكنها تؤثر على الأنسجة بشكل يختلف عن تأثير رابع أكسيد الأوزميوم. فلقد وجد أن الحمض النـووى الرايبوزى (RNA) وكذلك الهستونات (Histones) تتحطم وتختفي بفعـل هذا المثبت (شكـل ٩ ـ ٤)، لذا فإن استخـدام مثل هذه المادة غير مناسب للعمليات الروتينية. كما وجد أن العينات المثبتة في البرمنجنات تتأثر بمحلول الكحول الاثيلي المستعمل لنزع الماء من النسيج. ومن المعروف، أن رابع أكسيد الأوزميوم يعمل على ربط البروتينات، بينما برمنجنات البوتاسيوم تذيب بعضا من هذه البروتينات ويترك البعض الآخر في صورة متغيرة.

وحيث إن هذا المثبت غير محبذ الاستخدام في مجال التثبيت للمجاهر الإلكترونية في الوقت الحالي، فإن المكونات المستخدمة للتثبيت التي وضعها (Luft 1956) لم يحدث لها تطوير ويحضر كالآتي:

محلول أ: ١,٢٪ برمنجنات البوتاسيوم، يحفظ في قارورة زجاجية داكنة ومحكمة الغلق عند درجة ٤°م.

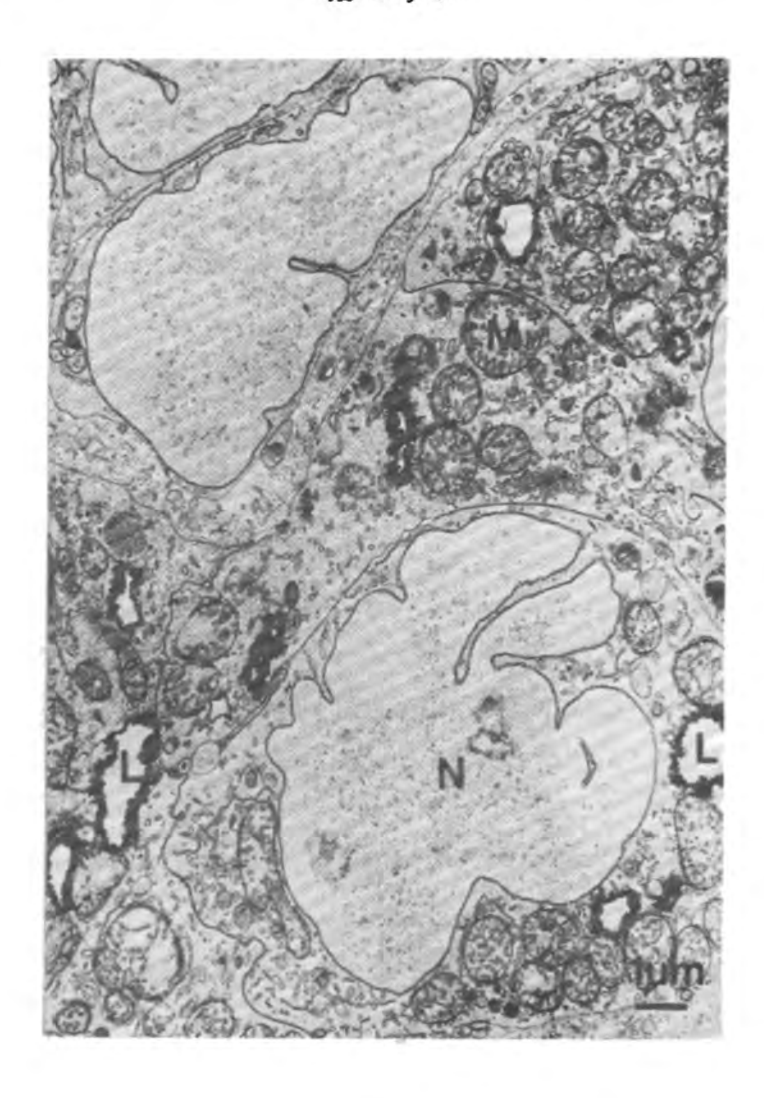
محلول ب: منظم بالاد (Palade's buffer) ويتكون من:

١٤,٧ جم فيرونالات الصوديوم (Sodium veronal).

٩,٧ جم خلات الصوديوم.

٥٠٠ مل ماء مقطر.

يحضر المثبت من محلولي أ، ب كما يلي:



شكل ٩ ـ ٤ : صورة من نسيج الاستيرويدات المبيضية والمثبت في برمنجنات البوتاسيوم.
(عن B. S. Weakley, 1981)

١٢,٥ مل من ٢,١٪ برمنجنات البوتاسيوم.
٥ مل منظم بالاد.
٢,٥ مل ماء مقطر.
٥ مل ١,٠ جزيء حامض الهيدروكلوريك.

ومن ثم يضبط الأس الهيدروجيني ما بين ٧,٣ - ٧,٤ باستخدام محلول حمض الهيدروكلوريك.

هذا المخلوط سوف ينتج عنه تركيز نهائي حوالي ٠,٦٪ برمنجنات البوتاسيوم وعند استخدام تراكيز أعلى من ذلك، ربما تكون أكثر تحطيما للأنسجة، ومدة التثبيت يجب أن لا تتعدى ساعة واحدة.

المحاليل المنظمة الشائعة الاستعمال في مثبتات المجهر الإلكتروني

لعله من المناسب الآن التطرق الى ذكر بعض المحاليل وبالذات المحاليل المنظمة شائعة الاستعمال، والتي تمزج مع مثبتات المجاهر الإلكترونية ومنها:

ا - محلول خلات الفيرونال المنظم Veronal Acetate Buffer

يستعمل هذا المحلول بشكل واسع ومنذ بداية استخدام المجاهر الالكترونية في مجال الأحياء حيث استخدمه العالم بالاد (Palade, 1952) مع مثبت رابع أكسيد الأوزميوم. ولا يمكن استخدامه في حالة التثبيت مع الألدهيدات نظرا للتفاعل الذي يتم بين محلول المثبت ومحول المنظم مما يقلل من عمل وفائدة هذا المنظم.

ب - منظمات فوسفاتية Phosphate Buffers

هذا المحلول أصبح شائع الاستعمال لكلا من مثبتات الألدهيدات ورابع أكسيد الأوزميوم. ويعرف مثل هذا المحلول، بالمحلول الفسيولوجي المنظم، نظرا لوجوده في الأعضاء الحية، وليس له أي تأثير سمي، كما يمتاز بأن قوته التعديلية عند الأس الهيدروجيني pH 7.4 قوية.

يعتـبر محلول ميلونـج الفـوسفاتي المنظم (Millonig's phosphate buffer) مناسبًا وشائع الاستعمال في حالة مثبت رابع أكسيد الأوزميوم بسبب قلة تأثيره على البروتينات وغيره من المكونات الخلوية خلال عمليات التثبيت. هذا وتجدر الإشارة إلى أن محلول الفوسفات المنظم يترسب بسرعة ولا يفضل استعماله في المثبتات التي تحوي كاتيونات ثنائية الشحنة مثل (Ca^{2+}) ، وكذلك لا يستعمل في كشوف كيمياء الخلية التي يستخدم فيها الرصاص لنفس الأسباب.

جـ ـ منظم الكاكوديلات Cacodylate Buffer

لقد استعمل سباتينى وزملاؤه محلول كاكوديلات الصوديوم المنظم عام ١٩٦٣ (Sabatini et al. 1963) كمحلول منظم لمثبت الجلوترألدهيد، ولكن هذا المحلول المنظم يتـأثـر بكـل من رابع أكسيد الأوزميوم والألدهيدات، ومع هذا فكثير من الباحثين يعتبرون هذا المحلول أفضل من منظم الفوسفات ويناسب أنسجة معينة. محتويات هذا المنـظم الـزرنيخية تقلل من تلف البكتريا، ولكن تجعل هذا المحلول ذا سمية عالية. لذلك يجب أن تقاس محاسن هذا المنظم بمخاطره عند استعماله.

هذا وسوف نسرد طرق تحضير هذه المنظمات في الباب الخاص بالمنظمات.

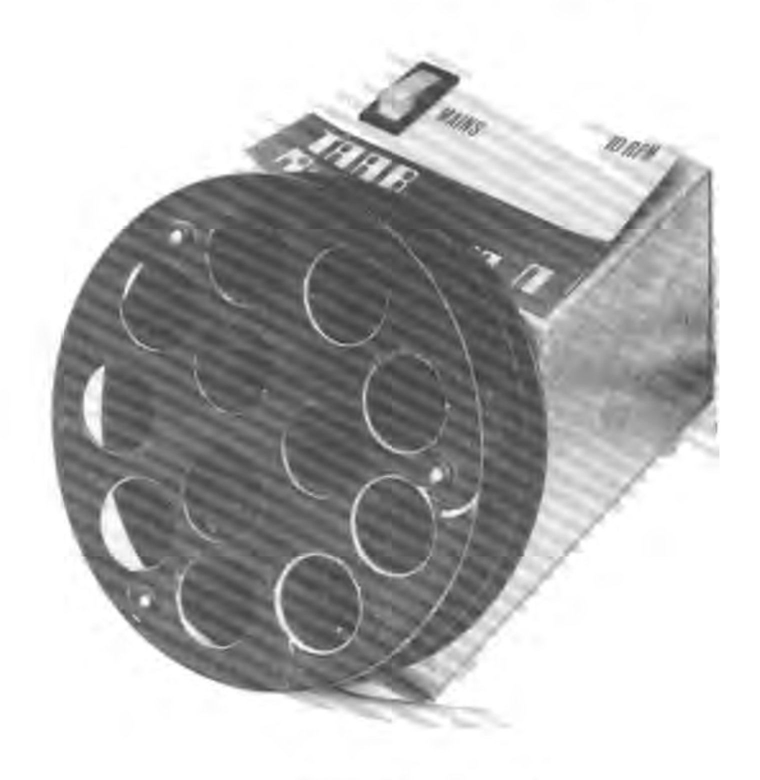
ثانيا: التجفيف والطمر Dehydration and Embedding

لكي نحصـل على قطاعات رقيقة جدا صالحة للمجهر الإلكتروني، فلابد من تخلل مواد الــطمـر الى داخـل النسيج، لكي تدعم وتقلل من تكسر النسيج أثنـاء التقطيع. ومواد الطمر المستعملة في مجال المجهر الإلكتروني عديمة الامتزاج بالماء، لذا يتوجب نزع الماء من العينة أولا ثم إحلال ماء النسيج بمادة قابلة للامتزاج بكل من الماء ومادة الطمر قبل إدخال مادة الطمر إلى أعماق النسيج.

وهناك عدد من المواد المجففة المستعملة في هذا المجال لغرض نزع الماء، مثل الاسيتون (Acetone) والكحول المثيلي والأثيلي، ولكن الكحول الإثيلي أكثرها شيوعا في

الـوقت الحاضر لنزع الماء من الأنسجة المثبتة لعدم تأثيره على طبيعة النسيج الخلوى مقارنا بالمواد المجففة الأخرى. ونظرا لأن الكحول الإثيلي مذيب جيد للدهون، فلابد من إتمام عملية التجفيف بسرعة حتى نحد من إذابة المكونات الدهنية للنسيج.

وإذا ما نقـل النسيج من المثبت إلى محلول الكحول الإثيلي المطلق مباشرة ينتج بعض التحطم الميكانيكي للنسيج نتيجة للتغير في الشد السطحي، لذا يفضل أن يمرر النسيج في سلسلة من التراكيز المختلفة (٥٠، ٧٠، ٩٠، ١٠٠٪) ولمدة عشر دقائق في كل تركيز حتى يتم نزع الماء بشكل متدرج. كما يفضل أن توضع الأنابيب (Vials) المحتوية على العينة المجففة في جهاز تحريك (شكل ٩ ـ ٥) أو على قاعدة خلاط خلال هذه العملية للإسراع من عملية الاستبدال.



وإذا كانت مادة الطمر تمتزج بالكحول الأثيلي فلا مانع من نقل النسيج مباشرة إليها، ولكن إذا كانت مادة الطمر لا تمتزج مع الكحول الاثيلي، فلابد من نقل النسيج إلى سائل آخر يمتزج بكل من الكحول الأثيلي ومادة الطمر. ويستعمل لهذا الغرض مادة الأيبوكس بروبان (Epoxypropane) ولمدة نصف ساعة تقريبا لتساعد على نفاذ مادة الطمر إلى النسيج. ينقل بعدها النسيج إلى خليط بنسبة ١ : ١ من الإيبوكس بروبان ومادة الراتينج (Resin)، ويترك في جهاز التحريك من أربع إلى ست ساعات، بعدها ينقل النسيج إلى مادة راتينج نقية، ويترك ليلة كاملة، وهي ما زالت في جهاز التحريك لكي ينفذ الراتينج الى النسيج بشكل تام.

بعد تمام عملية إدخال الراتينج، ينقل النسيج إلى مادة راتينج جديدة وحديثة في الوعاء الذي سوف يطمر فيه النسيج نهائيا، سواء كان كبسولة جيلاتينية أو بلاستيكية أو غيرها من الأشكال التي تصنعها عدة شركات عالمية لهذا الغرض، والتي غالبا ما يكون حجمها مناسبا لماسك العينة (Chuck) في جهاز القطع الدقيق.

بعد نقل العينة الى الكبسولة وبمساعدة إبرة رفيعة جدا، يمكن تحريك ووضع النسيج في الاتجاه المناسب لعملية التقطيع، ثم توضع البيانات الخاصة بتلك العينة مكتوبة على ورقة صغيرة بالحبر الشيني بحيث تكون الكتابة للناحية الخارجية من الكبسولة. تنقل هذه الكبسولات أو غيرها من أوعية الطمر بعد ذلك إلى فرن عند درجة حرارة ٤٠°م، وتترك لمدة ليلة كاملة لكي تتم عملية البلمرة، وفي الصباح التالي تنقل هذه العينات الى فرن درجة حرارته ٦٠°م وتترك ليلة أخرى لاتمام عمليات البلمرة وتصلب مادة الراتينج، بعدها تخرج الكبسولات وتحفظ لوقت التقطيع.

أنواع مواد الطمر Types of Embedding Media

لكي تنفذ أشعة الإلكترونات خلال قطاعات النسيج، فلابد من الحصول منها على قطاعات رقيقة جدا لاتزيد سماكتها على ١٠٠ نانومتر (١ , ٠ ميكرون). ولا يمكن الحصول على قطاعات بمثل هذا السمك في مواد الطمر العادية المستخدمة في مجال

المجاهر الضوئية كشمع البرافين. لذلك حاول العلماء منذ بداية عهد المجهر الإلكتروني باستبدال هذه المواد بمواد طمر مناسبة يمكن بها الحصول على هذا السمك من القطاعات ومن هذه المواد ما يلي:

١ ـ مادة الميثا أكريلات Methacrylate

تعتبر مادة الميثاأكريلات من أولى المواد التي استخدمت كمادة طمر لعينات المجهر الإلكتروني، بالرغم من وجود عدة مساوىء لهذه المادة، منها انكماش النسيج خلال عمليات البلمرة، وكثرة الفقاعات الهوائية المتكونة حول العينة المطمورة، إذا لم تؤخذ الاحتياطات اللازمة، كما أن القطاعات التي يحصل عليها من عينات مطمورة في تلك المادة نجدها تتأثر بالحرارة عند فحصها في المجهر الإلكتروني (والذي يفقد منها ما بين ٤٠ ـ ٦٠٪). هذا ونجد أن القطاعات للمجهر من عينات مطمورة في الميثا أكريلات قابلة للتحطم أو التكسر (Fragile) ولابد من تحميلها على شبكات نحاسية مغطاة بأحد أفلام السلويدين أو الفورمفار أو الكربون الرفيعة. وقد وجد أن خلط مركبي أكريلات البيوتيل وأكريلات المثيل (Butyl and Methyl Acrylates) بنسب مختلفة ينتج عنه وسط طمر جيد صلب وناعم يمكن الحصول منه على قطاعات رقيقة تصل إلى ٥٠ نانومتر.

٢ ـ راتنجات الأيبوكسي Epoxy Resins

لقد وصف جلارت وجلارت عام ١٩٥٨ (Glauert, Glauert 1958) مادة الأرالديت (Araldite) كمادة طمر في مجال المجهر الإلكتروني، ثم وصف كل من كوشيدا عام ١٩٥٩ (Kushida 1959) وفينك عام ١٩٦٠ (Finck 1960) مادة الأيبون كمادة أخرى مناسبة للطمر. وباستعمال هذه الراتينجات، أمكن التغلب على كثير من الصعوبات والمشاكل المعروفة عن مادة الميثااكريلات، فعمليات انكماش وتحطيم النسيج أثناء عملية البلمرة قلت وكذلك الحال مع الفقاعات الهوائية. هذا ولقد نقص معدل تكسر القطاعات عند فحصها بالمجهر إلى معدل ١٣ ـ ٣٠٪، ومع عدم استخدام أفلام دعامية للقطاعات المحملة على الشبكات النحاسية، وبشكل سريع أصبح الأرالديت والايبون هما مادتي الطمر الروتينية في عمليات المجهر الإلكتروني. كما وصف العالم سبر (Spurr 1969) راتنجا آخراً أطلق عليه اسم راتينج سبر، يتميز

بلزوجة منخفضة (Spuerr's low-viscosity epoxy resin) وسرعة نفاذ عالية، لكنه سريع التطاير وسام جدا، لذا يجب العناية الشديدة عند استخدامه.

٣ ـ راتنجات عديدات الاستر Polyester Resins

تمتاز هذه المواد ببعض صفات راتينجات الايبوكسي من تماثل في البلمرة وقليل من الانكماش، ولكن هذه المواد صعبة التقطيع وبعض من مكوناتها ذات حياة قصيرة.

٤ ـ مواد الطمر القابلة للذوبان في الماء
Water - Soluble Embedding Media

تمتاز مواد الطمرَ القابلة للذوبان في الماء بتوفير وقت الباحث نظرا لعدم الحاجة إلى القيام بعمليات التجفيف (نزع الماء)، إذا ما استخدمت مثل هذه المواد في الطمر. وسوف تتم عمليات التجفيف بكفاءة عالية عند غمس العينات في تراكيز متزايدة من مادة الطمر. كما تمتاز مواد الطمر هذه بسهولة صبغ النسيج أو القطاع والتي من الصعب إجرائها في مواد الطمر غير القابلة للذوبان في الماء. ولقد وصف عدد من تلك المواد منها الأكون (Aquon) والدوركوبان (Durcupan) وميثااكريلات الجليكول (Glycol methacrylate) ، وكذلك ميتااكريلات هيدروكسي البروبيل (Hydroxy propyl methacrylate) . لكن يعتبر الميثاكريلات من أنسب تلك المواد استعمالا.

الفصل العاشر

التقطيع والتحميل

● مقدمة ● أجهزة القطع
● تجهيز وتحميل القطاعات

مقدمــة

ليس الغرض من كتابة هذا الموضوع هو دراسة كل جهاز قطع على حدة كما هو عليه الحال في النشرات المرفقة مع كل جهاز والتي تصدرها الشركات المصنعة لتلك الأجهزة. فالشخص المبتدىء لابد وأن يعمل لعدة أيام في المختبر تحت إشراف أحد الفنيين المهـرة. مما يضمن اتقان خطوات العمل مع ضمان سلامة الجهاز أكثر مما لو اعتمد على طرق العمل في النشرة المرفقة.

ومن المعروف أن أجهزة القطع الخاصة بالمجهر الإلكتروني عبارة عن تطوير لأجهزة القطع الخاصة بالمجاهر الضوئية، مع تطوير ميكانيكية تقدم العينة بشكل دقيق يضمن عملية الحصـول على قطاعات رقيقة. والجدير بالذكر أن سمك القطاع يلعب دورا أساسيا في عمليات التبيين (Resolving power) ، فكلما قل سمك القطاع كلما زادت قوة التبيين ولهذا تطورت أجهزة القطع في السنوات الأخيرة حتى أصبح من الممكن الحصول على قطاعات رقيقة جدا يتراوح سمكها بين ٠,٠٥ - ٠,٥ ميكرومتر. أما المـدى المستعمل في عمليات التقطيع في وقتنا الحاضر فيتمثل في ثلاث درجات من سمك العينة كما هو موضح في الجدول (١٠ - ١).

ونظرا للتكامل ما بين المجهر الضوئي والإلكتروني، فمن الأفضل أن يكون جهاز القطع

ذو قدرة على عمـل قطاعـات سميكـة (١ ـ ٥ ميكـرومتر) لأغراض المجهر الضوئي وقـطاعـات رفيعـة (٠,٠١ ـ ٠,٢ مكيرومتر) للمجهر الإلكتروني من نفس العينة. وسوف نتطرق إلى ذكر بعض الملاحظات العامة حول عمليات التقطيع (Microtomy).

جدول (١٠ ـ ١) سمك القطاعات المستعملة مع المجاهر المختلفة

نـــوع المجـــهر	سمك القطاع (ميكرو ميتر)
١ ـ المجهر الضوئي	١ ـ ٤٠
٢ ـ المجهر ذو الأطوار المتباينة	٠,٢ ـ ٤
٣ ـ المجهر الإلكتروني	٠,٠١ ـ ٠,٢

أجهـزة القطـع

السكاكين Knives

في بداية عهـد المجهـر الإلكـتروني كانت تستخـدم السكـاكـين الفـولاذية (Steel knives) والمستخدمة في أجهزة تقطيع المجهر الضوئي للحصول على قطاعات رقيقـة، لكن المشـاكـل النـاتجـة عن تكرار عمليات سنها (شحذها) (Sharpening) وصيانتها الدائمة حثت المهتمين بهذا الحقل في التفكير في إيجاد بدائل أكثر ملاءمة. لذا استبدلت بالسكاكين الزجاجية (Glass knives) والسكاكين الماسية (Diamond knives). وقد شاع استخدام السكاكين الزجاجية لما تمتاز به من سهولة في الصنع والتحضير مع الرخص نسبيا في الثمن، ولذا يسهل التخلص منها عند عدم جدواها. وهناك شروط يجب أن تتـوفـر في سكـين القـطع المجهر الإلكتروني كأن يكون نصف قطر حافتها المستعملة للقطع أصغر من سمك أرق قطاع يراد الحصول عليه وأن تكون صلبة حتى تكون قادرة على قطع العينات الصلبة. كما يجب أن تكون مصنوعة من مادة نقية بحيث تكون حافة القطع متجانسة في جميع أجزائها وأن تكون مقاومتها للتآكل الكيميائي عالية.

١ ـ السكاكين الزجاجية Glass Knives

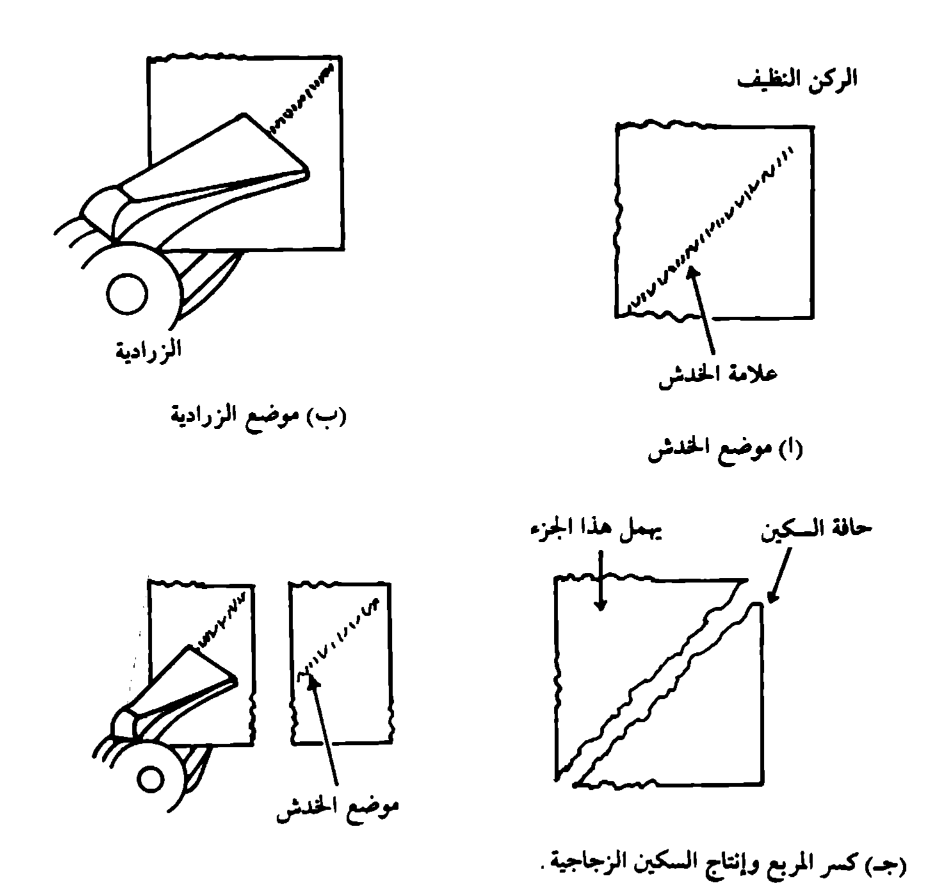
لقـد أدخـل العالمان (Latta and Hartmann) عام ١٩٥٠م استعمال السكاكين

الزجاجية لأول مرة في مجال تقنية المجهر الإلكتروني وأثبتا أنها من أكثر أدوات القطع شيوعا واستعمالا للأسباب آنفة الذكر. ولقد وضعت طرق عدة لعمل هذه السكاكين ولكن نسبة السكاكين الصالحة للاستعمال منها كانت دائما قليلة، مما جعل البعض يفكر جديا في تطوير هذه العملية، نجم عن ذلك قيام العالم (Fahrenbach) بتطوير جهاز لقطع السكاكين الزجاجية والذي يسوق الآن عن طريق شركة (LKB) السويدية (شكل ١٠ ـ ١). هذه الآلة تنتج وبدقة سكاكين زجاجية جيدة قلما يوجد مختبر مجهر إلكتروني يستغنى عنها. مع العلم أنه يمكن تحضير هذه السكاكين يدويا (شكل ١٠ ـ ٢).

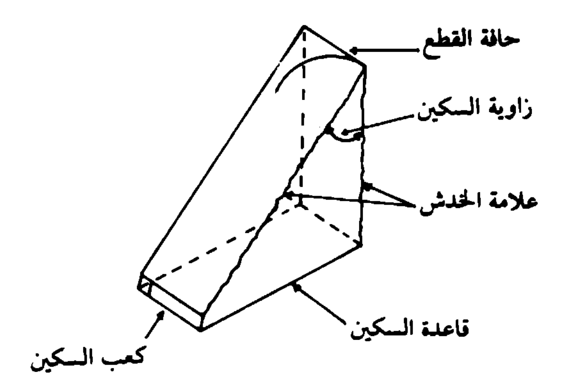
وتعتمد الطريقة المستخدمة لإعداد السكاكين الزجاجية على شكل السكين والتي يحددها ماسك السكاكين في جهاز القطع الدقيق (Ultramicrotome). وتعتبر السكين المثلثة الشكل أكثر الأشكال شيوعا في الاستعمال. وتحضر من تقطيع قضبان زجاجية إلى مربعات متشابهة والتي تشطر عند قطرها الى قطعتين مثلثتين متساويتين تقريبا، وتستعمل الحافة الحادة ذات نصف القطر الصغير للقطع (شكل ١٠ ـ ٣).



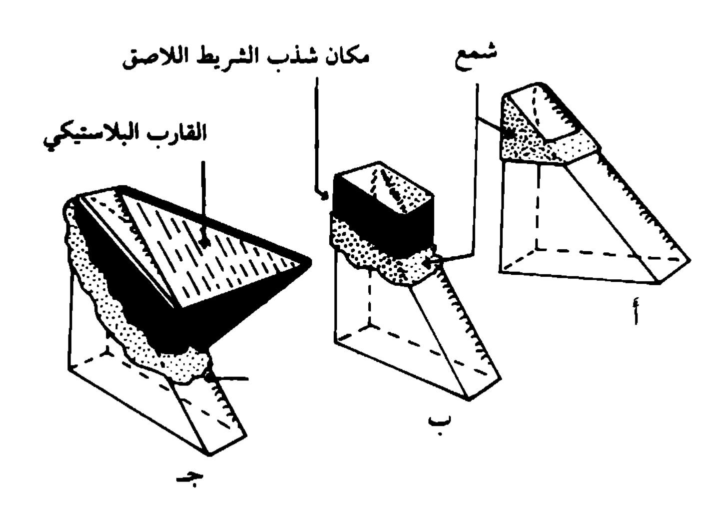
شكل ١٠ ـ ١ : جهاز تحضير السكاكين الزجاجية (الصورة من شركة KB



شكل ١٠ ـ ٢ طريقة عمل سكاكين زجاجية من مربعات أطوالها ٢٥ مم يدويا .



شكل ١٠ ـ ٣أ: رسم تخطيطي لمظهر سكين زجاجية صالحة للقطع.



شكل ١٠ ـ ٣ب: رسم تخطيطي يوضح قارب الماء للسكين الزجاجي.

(ا) قارب الماء لقطاعات من سمك ١ ميكرون (سحبة من الشمع).

(ب) قارب الماء المعمول من شريط معدني لا صق ورقيق معد للقطاعات الرقيقة جدا.

(جـ) قارب الماء المعمول من المعدن أو البلاستيك معد للقطاعات الرقيقة جدا.

ويجب أن تكـون حافة القطع في السكين مستقيمة ومتساوية وسطحها الأمامي المقابل لسطح العينة ناعما، وغالبا ما يكون جزءا من حافة القطع صالحا للحصول على قطاعات رقيقة، أما الباقي فيكون مشرشرا. والجزء الصالح غالبا ما يكون على يسار السكين عند وضعها في ماسك جهاز القطع. يحبذ أن يكون وضع السكين في ماسك جهاز القطع مائلة قليلا بزاوية تبلغ حوالي ٥ درجات لمحاولة تجنب لمس العينة لحافة السكين الخلفية.

وتعتمد مقاومة حافة القطع على نوع الزجاج المستعمل في عمل السكاكين. فهناك بعض أنواع الزجاج تصبح الحافة غير صالحة بعد عدد قليل من القطاعات بينما أنواع أخرى تبقى الحافة حادة ويحصل منها على قطاعات كثيرة جدا. كما تعتمد مقاومة الحافة على صلابة العينة ومادة الطمر وحجم العينة المراد تقطيعها وكذلك سمك القطاعات. ولإطالة حياة السكين يفضل أن يستخدم الثلث الأوسط من السكين لتقليم (شذب) العينة عند بداية التقطيع بينما يستعمل الثلث الخارجي الأيسر عند الرغبة في الحصول على قطاعات رقيقة. وعادة ما تعمل السكاكين قبل عمليات التقطيع بوقت قصير مع حفظها في صندوق نظيف بعيدا عن ذرات الغبار.

٢ ـ السكاكين الماسية Diamond Knives

سكاكين الماس واسعة الانتشار ومتوفرة، بالرغم من ارتفاع تكاليفها ولكنها مفيدة جدا، وتمتاز ببعض المميزات منها توفير الوقت الذي غالبا ما يضيع في التحضير والتبديل والتعديل عند استخدام السكاكين الزجاجية. كذلك تمتاز هذه السكاكين بكونها حادة جدا أكثر من السكاكين الزجاجية وهي أساسية لقطع المواد الصلبة جدا مثل الاسنان والعظام.

ويمكن استعمال السكاكين الماسية لمدة طويلة نسبيا قد تصل إلى سنتين إذا أحسن استعمالها. وكما هو معروف أن الماس مادة هشة (brittle) لذا يجب الاحتياط التام بعدم تعرض حافة السكين الحادة للصدمات لكي تستعمل لفترة زمنية طويلة. كما يجب أن

تكون هذه الحافة دائما نظيفة مع إزالة جميع البقايا العالقة قبل الاستعمال. لذا نحاول دائما عدم تعريضها لذرات الغبار التي تسبب أضرارا كثيرة. وغالبا ما تنظف حافتها باستعمال عود خشب ناعم جدا مثل عيدان تنظيف الأسنان ويفضل معاملة هذه العيدان الخشبية بمحلول قلوي ضعيف قبل الاستعمال. وعادة ما تؤخذ القطاعات الأولى باستعمال سكين زجاجية، لكي نضمن وجود سطح ناعم نوعا ما قبل استعمال السكين الماسية. والجدير بالذكر أن السكاكين الماسية ويمكن سنها (شحذها) عند الحاجة إلى ذلك بشرط أن تكون حافتها الحادة خالية من الخدوش العميقة.

تجهيز وتحميل القطاعات

حوض الماء Trough

يمكن الحصول على قطاعات ذات سمك يصل إلى نصف ميكرون في وسط جاف، ولكن أقل من هذا السمك يتطلب أن تطفو القطاعات على سطح مائي خلف السكين بعد قطعها مباشرة. وعادة يعمل الحوض المائي، في حالة السكاكين الزجاجية، من الشريط اللاصق المعدني والذي لا يتأثر بالماء. وهذا الحوض ينتج من لف الشريط اللاصق حول السكين ليكون وعاء للماء، وعادة توضع نقاط من شمع البرافين لقفل الفتحات في هذا الوعاء (الحوض) عند قاعدة السكين (شكل ١٠ - ٣ب). أما بالنسبة لسكاكين الماس، فغالبا ما يكون الحوض المائي ثابت فيها دائما. ولقد أصبحت بعض الشركات تعمل أحواض مائية بلاستيكية للاستعمال في حالة السكاكين الزجاجية.

الشد السطحي للماء عال جدا وسوف يبلل قليلا الزجاج أو الماس، لذا فإنه من المفيد إضافة محلول ٢٠٪ اسيتون أو كحول في الحوض، مما ينتج عنه نقص في الشد السطحي. وحوض الماء لابد من ملئه تماما حتى يكون مستوى الماء مساويا لمستوى حافة السكين، مما يقلل من فقدان القطاعات عند حافة القطع. إذا حدث أن سطح الماء أعلى من حافة القطع فإن العينة عند مرورها خلال حافة السكين سوف تلتقط معها الماء، أما إذا كان مستوى الماء أقل من مستوى حافة القطع في السكين فإن القطاعات

لن تطفو على سطح الماء بشكل مرضي. ويجب الحذر الشديد والمحافظة على النظافة التامة لجميع الأشياء المستعملة لكي تقلل من تلوث القطاعات قدر الامكان.

رؤية القطاعات وسمكها Section Viewing and Thickness

لابد من توفر بعض أدوات الرؤية المساعدة والتي تتمثل في عدستي مجهر ضوئي ذات تكبير يتراوح بين ١٠× و٥٠×، ليس لرؤية القطاعات العائمة في حوض الماء فقط، بل وأيضا لتحميل القطاعات على الشبكات النحاسية. هاتان العدستان يجب أن تكونا في موضع يمكن الفاحص من الرؤية الجيدة عند التقاط القطاعات الرقيقة على الشبكات النحاسية. كذلك لابد من توفر مصدر ضوئي ينعكس ضوءه على سطح الماء ليتمكن الفاحص من رؤية سطح الماء بمساعدة عدستي الميكروسكوب الضوئي. وهـذا المصـدر غالبا ما يكون أنبوبة فلورسينية صغيرة مثبتة خلف السكين، وأحيانا تستعمل مصابيح التنجستن لكنها أقل كفاءة من الأولى بسبب عدم مناسبة ألوانها لرؤية سطح التلامس بين القطاعات والماء، وتأثير الحرارة التي تصدرها على عمليات التقطيع وتقدم جهاز القطع. هذا مع العلم أن بعض الشركات المصممة لأجهزة القطع تصنع كلا النوعين من الإضاءة.

تعطي سمك القطاعات التي تستخدم للمجهر الإلكتروني ألوان مشابهة للألوان التي يعطيها فلم رفيع من الزيت فوق سطح الماء. انه من الصعب وصف تدرج الألوان في القـطاعات لشخص مبتدىء ولكن من المفضل أن يتولى عمل بعض القطاعات شخص ماهر ويشاهدها المبتدىء لكي يكون على معرفة بالألوان.

ويعتمد سمك القطاعات وجودته على جودة حافة سكين القطع، وكذلك على أبعاد العينة المقطوعة وشكلها. ويجب ألا يغيب عن الذهن أن الألوان تتغير قليلا مع الزاوية التي ترى فيها هذه القطاعات.

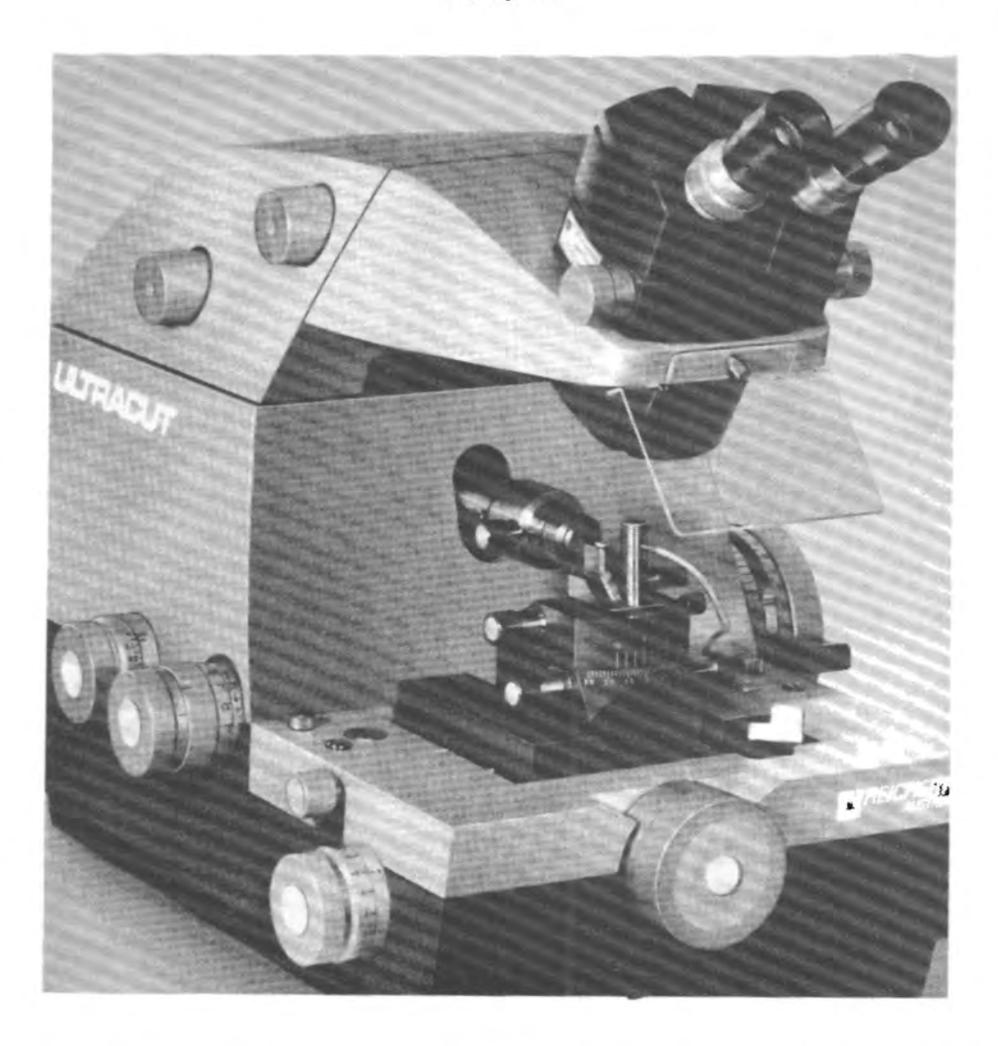
يمكن سرد الألوان التقريبية والسمك في الجدول رقم (١٠ ـ ٢).

جدول (١٠ ـ ٢)

اللـــون	السمك (ميكروميتر) (μm)	الغـــــــرض
رمادى	٠,٠١٠ ـ ٠,٠٦٠	للحصول على قوة توضيح عالية.
فضي	٠,٠٦٠ ـ ٠,٠٩٠	لمعظم الأغراض.
ذهبي	٠,٠٩٠ ـ ٠,١٥٠	قوة التكبيرالمنخفضة وفي حالة استخدام المواد المشعة.
بقمي	٠,١٥٠ ـ ٠,١٩٠	
أزرق	٠,١٩٠ ـ ٠,٢٤٠	قطاعات سمكية وغير صالحة للاستعمال
أخضر	٠,٢٤٠ ـ ٠,٢٨٠	في حالة المجهر الإلكتروني النفاذ.
أصفر	٠,٢٨٠ ـ ٠,٣٢٠	

تشذيب العينة Trimming the Block

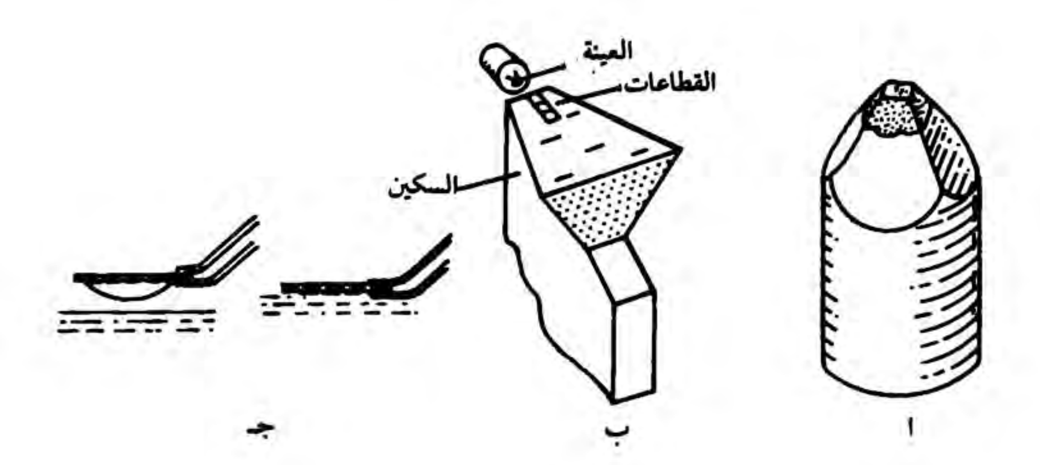
معظم أجهزة القطع (شكل ١٠ ـ ٤) مزودة بأداة خاصة لماسك العينة (Chuck) تكون صالحة لمختلف العينات (شكل ١٠ ـ ٥). وهنا لابد من قطع العينة إلى حجم معقول مع جزء من مادة الطمر وتثبيتها في ماسك العينة ومن ثم محاولة تشذيبها تحت مجهر تشريح باستخدام شفرات حادة حتى يتم توضيح العينة المراد تقطيعها وترك أصغر كمية من مادة الطمر حولها (شكل ١٠ ـ ٦أ). لتحصل على أصغر مساحة قطع ممكنة وتصل عادة المساحة المفضلة إلى حوالي ٢, ٠ ـ ٤, ٠ مم٢، ومن المفضل استخدام شفرة جديدة وحادة بالنسبة لعمليات التهذيب النهائية لكي يكون السطح ناعم ما أمكن لكي لا يؤثر على السكين عند القطع. هذا مع العلم أن هناك بعض الشركات قد أنتجت أجهزة تشذيب أو تهذيب (Trimmer) مثل شركة LKB (شكل ١٠ ـ ٧) ولكن هذه الأجهزة صالحة لعمليات التشذيب الأولية، أما التهذيب النهائي فمن المفضل استخدام اليد وبشفرات جديدة وحادة.



شكل ١٠ ـ ٤ : جهاز تحضير القطاعات الرقيقة المستخدمة للفحص في المجهر الإلكتروني النفاذ (الصورة من شركة ريخرت)



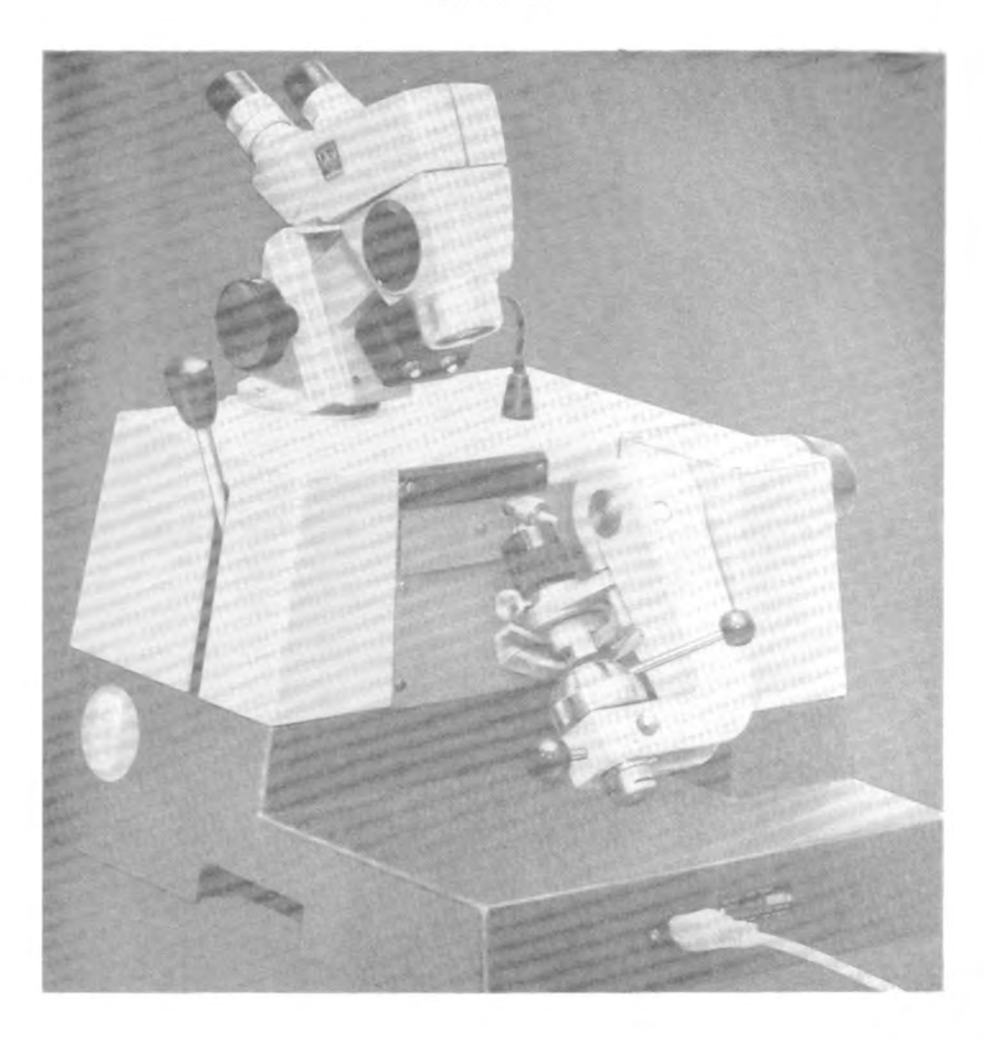
شكل ١٠ ـ ٥ بعض أنواع ماسك مكعبات العينات المطمورة في الراتنج والمستخدمة للتقطيع في جهاز القطع الدقيق. (الصورة من شركة LKB)



شكل ١٠ ـ ٦ : ا ـ عينة مثبتة ومطمورة في الراتنج ومن ثم مشذبة وجاهزة لتقطيعها باستخدام جهاز القطع الدقيق.

ب ـ سلسلة من القطاعات الرقيقة على السطح طافية في الحوض المائي للسكينة الزجاجية، وجاهزة للقطها على الشبكة النحاسية.

جـ ـ عملية التقاط القطاعات على الشبكات النحاسية.



شكل ١٠ ـ ٧: جهاز تشذيب العينات من نوع (TM60). (الصورة من شركة ريخرت)

معاملة القطاعات في الحوض المائي Treatment of Section on the Water Bath

خلال عمليات القطع، أحيانا تعاني القطاعات من انضغاط على طول محورها وعند الزاوية اليمنى للسكين ويصاحب ذلك زيادة في السمك. إذا كان هذا الانضغاط بسيطا يمكن تجاهله، ولكن في حالة القطاعات الرقيقة جدا يكون واضحا كثيرا. وينتج عن هذا الانضغاط التفاف القطاعات من جانب واحد، وللتخلص من تلك الظاهرة، يجب إما نقل القطاعات إلى حمام مائي ساخن أو إجراء عملية أبسط، ألا وهي الإمساك بقطعة من ورقة الترشيح المغموسة في الكلوروفورم عدة سنتيمترات فوق حوض الماء الذي فيه القطاعات. أبخرة الكلوروفورم سوف تعمل على تمديد القطاعات وبالإمكان ملاحظة ما يحدث من تمدد وزيادة في الحجم وكذلك تغير في اللون تحت عدستي المجهر الضوئي.

تحميل القطاعات فوق الشبكات النحاسية Mounting of Section on the Grid

يمكن تحميل القطاعات الطافية في الحوض المائي على الشبكات النحاسية بطرق مختلفة، منها غمر الشبكة النحاسية تحت القطاعات في الماء، ومن ثم رفع القطاعات فوق الشبكة ثم وضعها على ورقة ترشيح لتجفيف الزائد من الماء. وهذه الطريقة صالحة في حالة الشبكات الخالية من الأفلام الدعامية. أما الطريقة الأكثر استعمالا والتي تصلح لكلا النوعين من الشبكات سواء كانت مغطاة بأفلام دعامية أو غير مغطاة، تتم بالتقاط القطاعات عن طريق وضع الشبكة فوق القطاعات العائمة فوق الماء، ثم قلب الشبكة بحيث تكون القطاعات للأعلى على ورقة ترشيح لاستخلاص الزائد من الماء. عند تحميل القطاعات لابد من تجميع أشرطة القطاعات (Ribbons) أو القطاعات المنفردة مع بعضها ومحاولة لإلتقاط القطاعات في مركز الشبكة النحاسية. تجميع هذه القطاعات عادة يتم بمساعدة فرشاة مكونة من شعرة مفردة تؤخذ عادة من رمش العين وتثبت في حامل خاص بها (شكل ١٠ ـ ٦ب، جـ).

صعوبات التقطيع Difficulties in Sectioning

١ ـ صعوبة الحصول على قطاعات رقيقة

وهذا ينجم عن عدة أسباب يمكن سردها تحت ثلاث مجموعات هي:

ا - إذا كانت العينة كبيرة الحجم، أو أنها تحتوي على نسيج صلب جدا، أو أن عملية الطمر رديئة. ففي هذه الحالة حاول أخذ عينة من وسط الطمر بدون نسيج لمساحة قدرها ١ مم٢ لكي تكشف عن الأسباب السالفة الذكر.

ب - إذا كانت السكين رديئة أو لم تضبط تماما في مكانها الخاص، فيجب التأكد مع استبدال السكين.

جـ - قد يكون في جهاز التقطيع خلل ما، ويتأكد من ذلك عن طريق فحص ماسك العينة، وماسك السكين ومدى درجة إحكام ربطهما.

٢ - الاختلافات في سمك القطاعات

وغالبا يرجع سبب ذلك إلى خطأ في جهاز القطع، لذا يجب التأكد من إحكام ربط ماسك العينة وسكين القطع، وكذلك ربما يكون الاختلاف في السمك ناتج عن ارتفاع درجة حرارة الجهاز أو أي اهتزاز آلي. لذا يجب تجنب اشعال لهب بنزن أو مصباح كهربائي بالقرب من جهاز القطع مع تفادى التقطيع في أشعة الشمس المباشرة. غالبا كل أجهزة التقطيع، إذا حدث أن السكين غير حادة نجد القطاعات الناتجة تتعاقب قطاع رقيق ومن ثم سميك وهذا السميك ناتج عن تضاعف السمك للقطاع الرقيق والذي ينتج عن الضربة الثانية للسكين إذ أن الضربة الأولى لا يتم فيها قطع للعينة. ويمكن تجنب حدوث ذلك إما بتغيير السكين أو بتغيير جهاز التحكم في السمك لتحصل على قطاعات أسمك مما قبل.

٣ - حدوث بعض الخدوش على القطاعات عند الزاوية اليمنى لحافة السكين

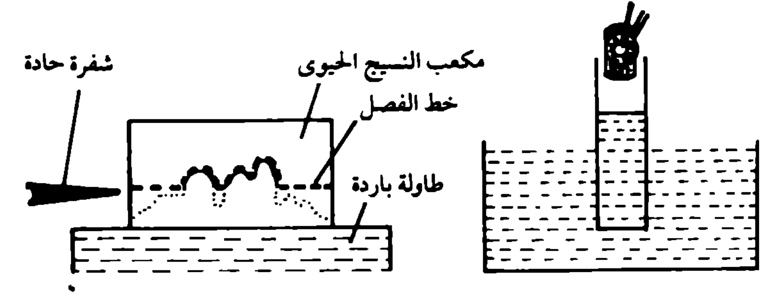
وهذا يحدث بسبب أن حافة القطع في السكين غير جيدة، ويصعب تجنب حدوث ذلك تماما وخاصة عندما نريد الحصول على قطاعات رقيقة. مع أن تلك القطاعات الرقيقة غالبا ما تستعمل في حالة قوى التكبير العالية والتي تستخدم فيها مساحات صغيرة جدا من القطاعات مما يمكن فحص الأجزاء ما بين تلك الخدوش في القطاعات. والجدير بالذكر أن وجود مواد صلبة في النسيج مثل قطع العظم سوف تتلف حافة السكين في تلك المنطقة وينتج عن ذلك قطاعات منفردة.

طريقة نحت المتجمدات Freeze Etching

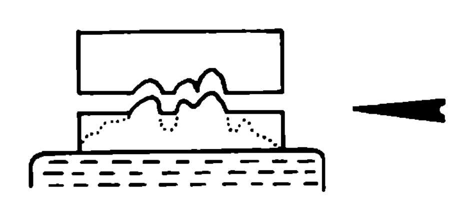
لقد بدأ استعمال هذه الطريقة مؤخرا، وأول من استعملها العالم ستير (Steer, 1957) عام ١٩٥٧ وطورها فيما بعد عدد من المهتمين والمشتغلين في هذا المجال ومنهم مور وزملاؤه، (Moor *et al.* 1961) عام ١٩٦١ وبوليفنت وآميز (Bullivant & Ames, 1966) عام ١٩٦٦ وبوليفنت (Bullivant 1970) عام ١٩٧٠ واستولنسكي وبريزفاش (Stolinski & Breathvath 1975) عام ١٩٧٥ وسلير وروباردو (Sleylr & Robards) عام ١٩٧٨ .

وتهدف هذه الطريقة إلى تحضير قوالب من الأسطح المتجمدة للعينات الطرية (اللينة) (Soft specimens) . ويعزى عدم إقبال المشتغلين في مجال المجهر الإلكتروني على استعمال هذه الطريقة من التحضيرات المجهرية إلى الصعوبة في تحضير العينة، ومع ذلك فقد تقدمت وأصبحت تستعمل على نطاق واسع بعد إدخال الأدوات المتطورة فيها .

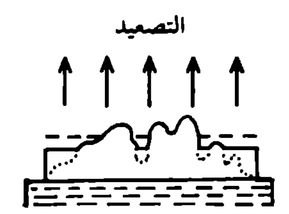
عملية نحت المتجمدات طريقة طبيعية، وفيها يتجنب استخدام المواد الكيمياوية لما تحدثه من تغيرات أثناء عمليات التثبيت والتجفيف والطمر والتقطيع . فالنسيج يجمد في النيتروجين السائل (ـ ٢١٠°م) . ثم يقطع النسيج باستعمال سكين باردة مما ينتج عنه فصل الخلايا (شكل ١٠ ـ ٨) وجدير بالذكر أنه أثناء تجميد النسيج وقطعه يكون سطح الجزء المقطوع منه محفوظا داخل مكان مفرغ تماما، ويحتفظ بالعضيات لكي تبقى سليمة، وهذا ما يعرف أو يسمى بالنحت (Etching). هذا النسيج المجهز سميك جدا، وكذلك السطح المقطوع غير متناسق لفحصه تحت المجهر مباشرة لذلك يحتاج الأمر لعمل قالب (Replica) لهذا السطح كما وصف سابق في طريقة عمل القوالب، وتتمثل في تبخير طبقة رقيقة جدا لخليط من البلاتين والكربون . يترك النسيج يسخن في ماء مقطر، ومن ثم فإن القالب سوف يطفو على سطح الماء . ويمكن التخلص من بقايا المواد العضوية المتبقية على القالب باستعمال التربسين (Trypsin) يليه حمض الكبريتيك أو قلوى قوى . بعد ذلك يلقط القالب على شبكة نحاسية وبهذا يكون جاهزا للفحص تحت المجهر الإلكتروني .



(ا) الوعاء الذي تجمد فيه العينة عند درجة ـ ٢٠٠°م. (ب) قطع العينة المجمدة باستخدام الشفرة الحادة.

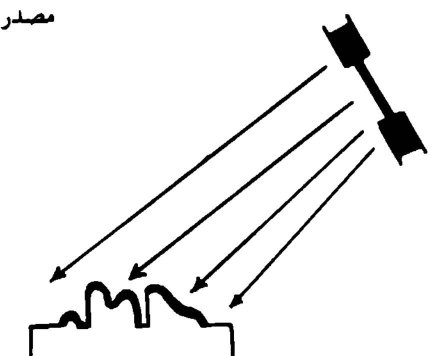


(جـ) فصل النسيج طبيعيا.



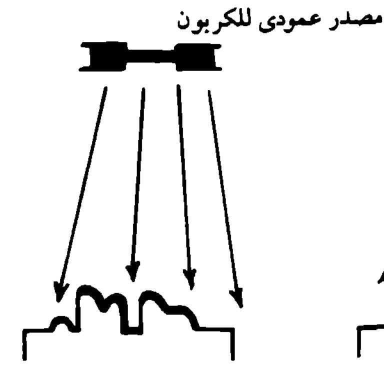
(د) تصعيد (تحويل الماء الصلب إلى بخار) الماء الموجود على سطح النحت.

مصدر ذو زاوية بخليط الكربون والبلاتين



(هـ) تكوين القالب وتظليله بخليط الكربون والبلاتين بزاوية مائلة.

مصدر عمودى للكربون



(و) تقوية سطح القالب بتبخير ذرات الكربون عليه عموديا.

شكل ١٠ ـ ٨: رسم تخطيطي يوضح تحضير عينات المجهر الإلكتروني بطريقة نحت المتجمدات (Freeze etching).

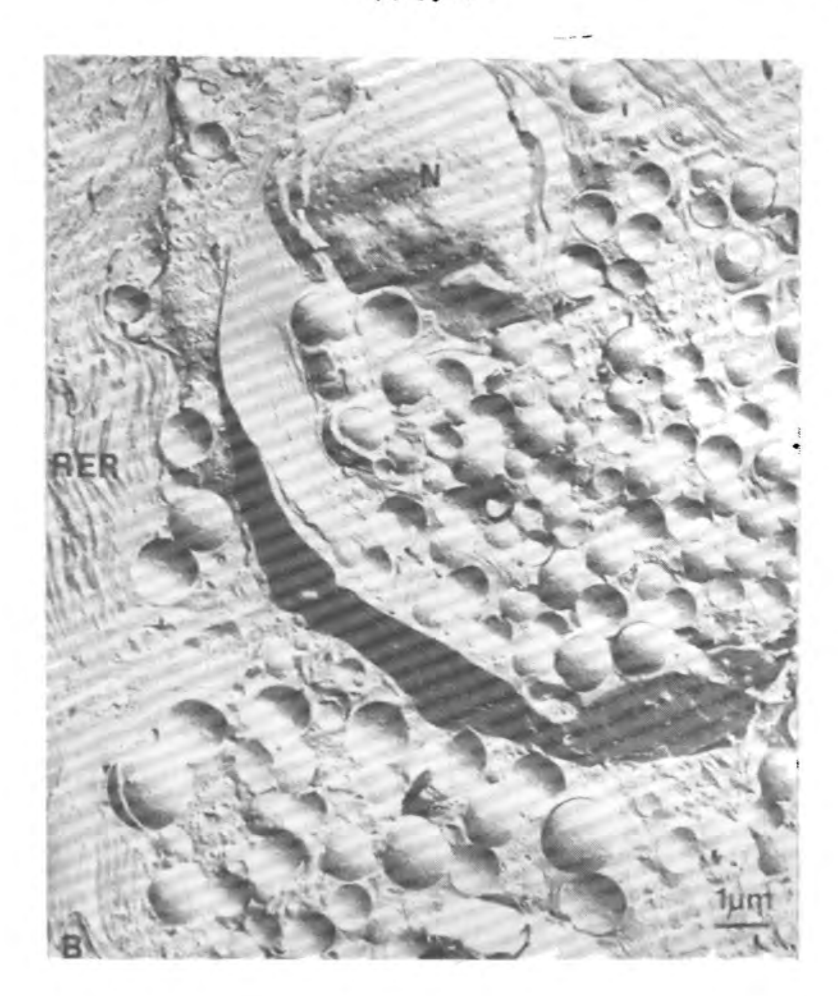
ومن مميزات طريقة نحت المتجمدات هذه دراسة التفاصيل للسطوح التي لا يمكن الحصول عليها بطرق تحضير أخرى.

فعملية قطع العينات المتجمدة يمكن وصفها بدقة أكبر على أنها عملية فصل (Splitting) للوحدات المكونة للأنسجة، ودراسة سطوح العضيات السيتوبلازمية من نواة وميتوكوندريا وأجهزة جولجي والحويصلات. ذلك أن السكين المستعملة في القطع تتبع الخط الأقل مقاومة في الخلية. ومثل تلك السطوح التي يمكن دراستها بالتفصيل تحت المجهـر دراسـة سطح النـواة وتـوزيع وأشكـال الفتحـات (الثقـوب النـووية Nuclear pore) المنتشرة عليه. وقد يحدث أحيانا قطع لبعض العضيات أو كذلك منظر يمثل ثلاثة أبعاد لها (Three dimentional views) ؛ ويعتمد هذا على طريقة القطع وحالته.

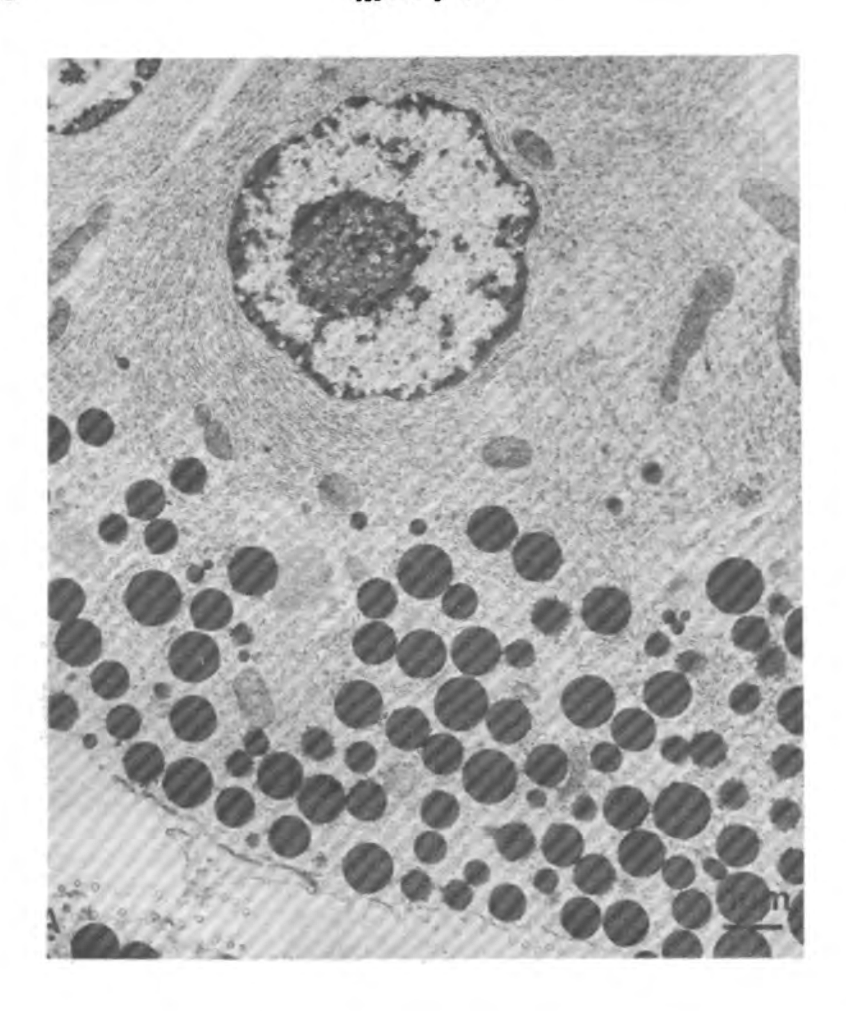
وبنـاء على هذا فإن التحضـيرات المجهـزة بطريقة نحت المتجمدات لا يمكن اعتبـارها قطاعات رقيقة، كما أنه لايمكن اعتبارها قوالب (Replicas) ، إنما هي في الحقيقة مزيج من الاثنين.

وعلى العموم، فالصورة التي شوهدت تحت المجهر الإلكتروني لقطاعات رقيقة من عينة ما باستعمال طريقة المثبتات الكيميائية وما يصحبها من طرق تحضير أمكن رؤيتها باستعمال طريقة نحت المتجمدات (شكل ١٠ ـ ٩، ١٠). هذا ويمكن الحصول على قوة تحليل (Resolution) جيدة، ويعتمد هذا أساسا على المعادن الثقيلة المستعملة في عمليات التظليل، فمثلا باستعمال قالب الكربون والبلاتين وجد أن قوة التحليل تصل ما بين ٢ ـ ٣ نانومتر.

وملخص ما سبق أنـه يمكن القـول بأن التحضـير باستخـدام طريقـة نحت المتجمدات قد اثبت (Confirmation) ما سبق الحصول عليه باستخدام طرق التثبيت ومـا يتبعها من صبغ وغيرها، والتي استخدمت من وقت ظهور المجهر الإلكتروني؛ وبالأخص المعلومات الهامة عن تركيب الأغشية الخلوية.



شكل ١٠ ـ ٩: صور لخلايا الجيوب البنكرياسية التي اخذت بطريقة نحت المتجمدات.
(عن B. S. Weakley 1981)



شكل ١٠ ـ ١٠: صورة لخلايا الجيوب البنكرياسية في قطاعات رقيقة أخذت بطريقة القطاعات الرقيقة ولنفس النسيج المفحوص بطريقة نحت المتجمدات.

(عن B. S. Weakley 1981)

التقطيع للمجهر الضوئي Sectioning for the Light Microscope

يحتاج المشتغلون في مجال المجهر الإلكتروني من فحص بعض القطاعات بالمجهر الضوئي، ومثل هذه الطريقة مفيدة جدا لمعرفة وتحديد الجزء المراد دراسته وخاصة عند الرغبة في دراسة مناطق متتالية من نفس العينة.

عندما نريد الحصول على قطاعات سميكة للمجهر الضوئي، يفضل أخذ عينات كبيرة نسبيا في حدود ٥ مم٢ وسماكة ٠,٥ مم وطمرها كما هو متبع في طريقة المجهر الإلكتروني، ثم تقطيعها باستعمال جهاز التقطيع الدقيق (Ultramicrotome). من السهل الحصول على قطاعات ما بين ٠,٥ - ٢ ميكرومتر، ثم تنقل هذه القطاعات بفرشاة أو حلقة مصنوعة من سلك معدني إلى شريحة زجاجية نظيفة عليها قطرة من الماء. تسخن هذه الشريحة على لهب موقد كحولي أو على صفيحة ساخنة (Hot plate) لكي نحصل على قطاعات منبسطة بعد أن تجف قطرة الماء، وبالتالي سوف تلتصق هذه القطاعات على الشريحة الزجاجية بدون إضافة أية مادة لاصقة. كما يجب ملاحظة عدم ترك قطرة الماء حتى تغلي، فحرارة التسخين يجب أن تكون لطيفة والتجفيف بطيئا حتى لا تتأثر القطاعات بالحرارة العالية.

يمكن فحص هذه القطعات باستخدام المجهرى ذي الطور المتباين أو صبغها بأية صبغة مناسبة، مثل صبغة أرزق التلويدين (Toluidine blue) ثم تضاف نقاط من مادة الطمر المستعملة في المجهر الإلكتروني، وبعدها يتم وضع غطاء الشريحة للحصول على تحضيرات مستديمة من الشرائح. وتمتاز هذه الطريقة بالسرعة حيث تتم كل العمليات من تقطيع وصبغ في دقائق قليلة جدا، وغالبا ما تعتبر هذه الخطوات الأولية رئيسية للحصول على قطاعات للمجهر الإلكتروني.

تعتبر القطاعات المصبوغة بصبغة أزرق التولويدين جيدة وصالحة لأخذ صور لها بالمجهر الضوئي، مع أن سمك القطاعات له تأثير على قدرة التوضيح وكذلك عمق التبئير (Focusing). ويحبذ ألا يخلو مختبر المجهر الإلكتروني من مجهر ضوئي مزود بآلة تصوير «كاميرا» جيدة لتيسير الحصول على صور مجهرية ضوئية.

الفصل الحادي عشر

الصبغ والفحص

● مقدمة ● الصبغة السالبة ● طريقة التظليل ● طريقة القوالب ● صبغ القطاعات الرقيقة جدا

مقدمة

يعني الصبغ بالنسبة للمشتغلين في مجال المجهر الإلكتروني زيادة التباين (contrast) للشيء المفحوص بوضع ذرات عنصر ذات عدد ذري أعلى من تلك الداخلة في تركيب النسيج أو العينة المفحوصة مثل الكربون والاكسجين والنيتروجين والهيدروجين وغيرها، والتي غالبا ما تكوّن مواد عضوية. فعملية التثبيت باستخدام مدة رابع أكسيد الأوزميوم سوف تضيف مبدئيا بعض ذرات عالية العدد الذري (العدد الذري للأوزميوم = ٧٦) إلى الأجزاء التي يتفاعل معها من العينة المثبتة مثل أغشية الدهون الفوسفاتية، الدهون غير المشبعة وبعض من مجاميع البروتينيات. كذلك البرمنجنات تصبغ أغشية الدهون الفوسفاتية ولكن مثبتات الالدهيدات لا تزيد في عمليات التباين. وعمليات الصبغ في المجاهر الإلكترونية تختلف في مضمونها ومفهومها عما هو معروف في المجاهر الضوئية، فهي تعني في حالة المجهر الضوئي تفاعل المواد ذات الألوان المختلفة (الصبغات) مع مكونات الأنسجة وإعطاءها ألوانا مختلفة، تختلف في درجة امتصاصها للضوء المرئي، بينما تعني في المجاهر الإلكترونية قدرة هذه

المواد الكيميائية، ذات الأوزان الذرية العالية ذات التفاعلات المتباينة مع مكونات الخلية المختلفة، على تشتيت الإلكترونات (شكل ١١ ـ ١أ، ب).

يمكن إجراء عمليات الصبغ إما قبل طمر العينات في مادة الطمر أو بعد عمليات التقطيع. فهناك صبغتان يمكن استعمالها قبل أو بعد عمليات الطمر، هما حمض التنجستيك الفسفوري (Phosphotungstic acid PTA) وخلات اليورانيل (Uranyl acetate) وكلاهما تذوب في مذيبات قابلة للجفاف. أو يمكن استعمال محلولها المائي في صبغ القطاعات، وتختلف الصبغتان عن بعضها البعض، فالأولى صبغة ذات شحنة موجبة (Cationic) ولذا ترتبط بالبروتينات وتعتبر صبغة جيدة للحويصلات الإفرازية (Secretory vesicles) والليفات العضلية (Fibrils) والكولاجين. أما الصبغة الثانية فهي صبغة ذات شحنة سالبة (Anionic) وهي صالحة لصبغ الحموض النووية، وكذلك البروتينات إلى حد ما.

ومن أهم الطرق المستخدمة في عمليات الصبغ في المجاهر الإلكترونية ما يلي:

١ ـ الصبغة السالبة Negative staining

٢ ـ طريقة التظليل Shadowing method

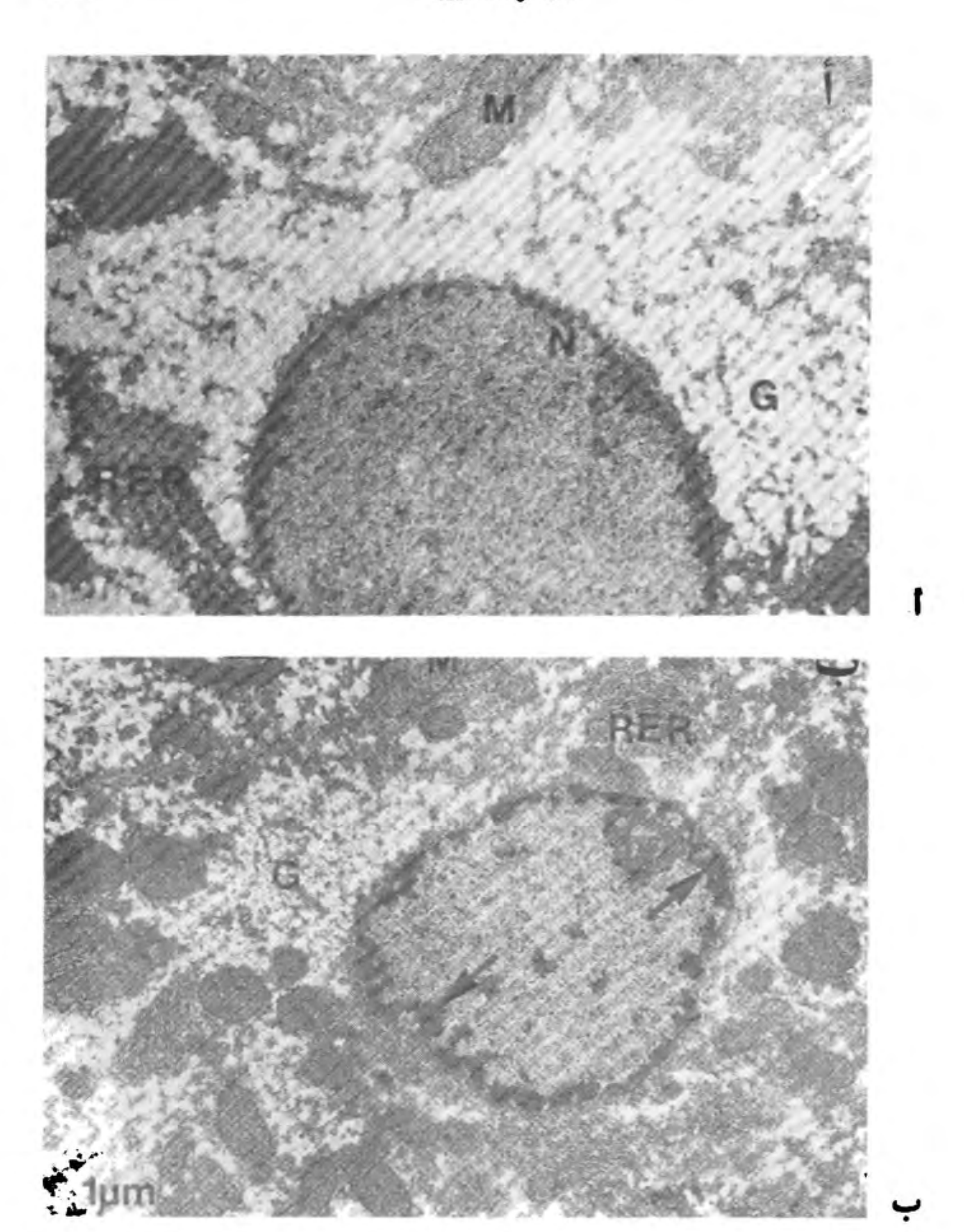
٣ ـ طريقة القوالب Replica method

٤ ـ الصبغة الموجبة Positive staining

٥ ـ (طريقة) نحت المتجمدات Freeze etching

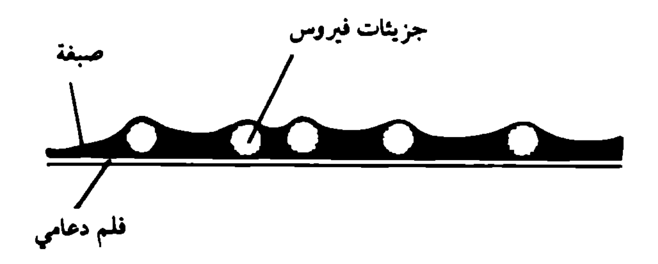
١ ـ الصبغة السالبة Negative Staining

تعتبر هذه الصبغة من أبسط وأسرع طرق الصبغ المستعملة في مجال المجهر الإلكتروني فهي تلعب دورا بارزا في توضيح التراكيب الدقيقة لبعض من العينات البيولوجية وخاصة الفيروسات وسطوح البكتريا وكذلك دراسة بعض العضيات السيتوبلازمية.



شكل ١١ ـ ١ : ا ـ صورة من قطاع في الكبد غير مصبوغ .
ب ـ صورة من قطاع في الكبد مصبوغ بـ٢٪ خلات اليورانيل المائية .
(عن B. S. Weakley 1981)

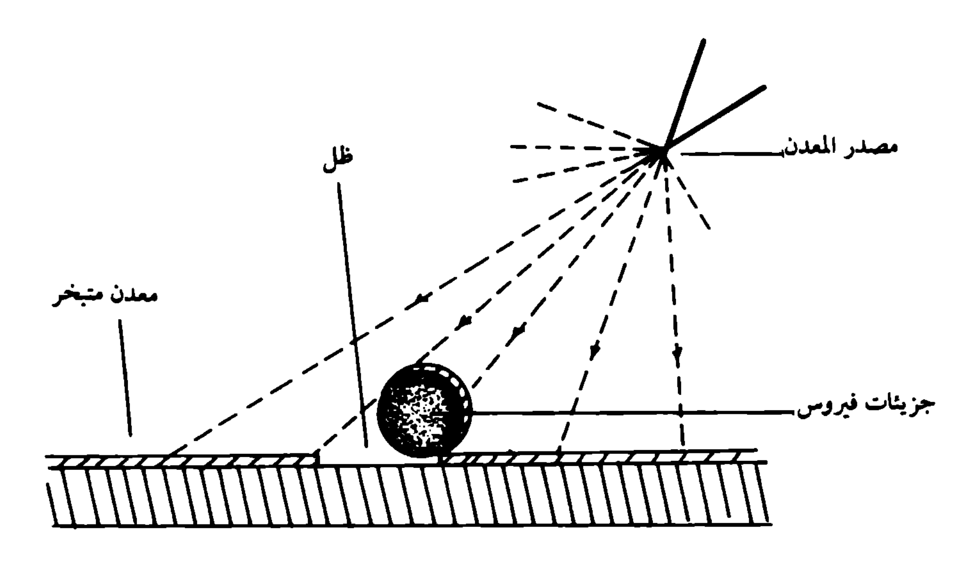
تتم عملية الصبغ بإضافة محلول مخفف من أحد أملاح المعادن الثقيلة إلى العينة المراد دراستها، ثم توضع قطرة صغيرة من هذا المحلول الذي يحتوي على العينة فوق شبكة نحاسية مغطاة بفلم دعامي رقيق من الكربون أو السلويدين (طريقة عمل الفلم موضحة بالفصل الثامن)، بعدها يزال الزائد من محلول الصبغة باستخدام حافة ورقة ترشيح ثم يترك الفلم الرقيق المتكون على سطح الشبكة النحاسية ليجف تماما. بذلك تصبح جزيئات المادة المراد دراستها قد انطمرت بالصبغة. عند فحص مثل تلك العينات من المتوقع أن تظهر الأجزاء المصبوغة كمناطق مضيئة فيما لو قورنت بالحقل المحيط بها. الجدير بالذكر أن الصبغة السالبة في الحقيقة تصبغ أرضية الحقل (Background) التي توجد عليه العينة (شكل ١١ ـ ٢).



شكل ١١ ـ ٢ : رسم تخطيطي يوضح طريقة عمليات الصبغة السالبة.

٢ ـ طريقة التظليل Shadowing Method

تعتبر هذه الطريقة من أقدم الطرق المستخدمة في صبغ عينات المجهر الإلكتروني. وتستخدم في تقدير حجم الجزيئات مثل الفيروسات والبكتريا وغيرها. كما تعتبر جزءا حيويا في عمليات القوالب وتعطي قوة تباين أكبر وتمكن من فحص الطول الثالث للجزيئات (شكل ١١ ـ ٣).



شكل ١١ ـ ٣: رسم تخطيطي يوضح طريقة التظليل.

٣ ـ طريقة القوالب Replica Method

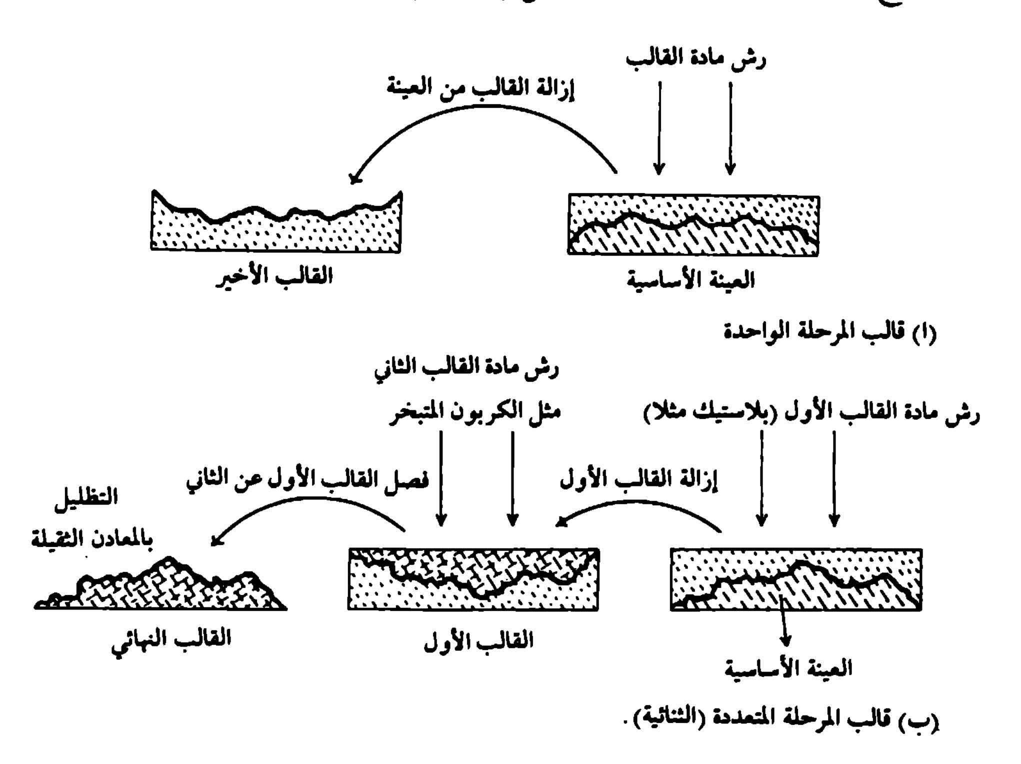
طريقة القوالب هي عبارة عن عمل فلم رقيق من المادة مشابه لطبوغرافية سطح العينة المفحوصة (Surface topography)، في البداية كان يستخدم هذا التكنيك للعينات غير الحية ولكن حديثا دخل استعمالها أيضا في مجال الكائنات الحية وخاصة دراسة خصائص سطح الخلايا وعلاقة العائل والطفيل وهي من أقدم الطرق المستخدمة في مجال المجهر الإلكتروني. هذه الطريقة تحتاج إلى مهارة عالية جدا، ومن أهم صعوبات هذه الطريقة هو فصل القالب (Replica) عن سطح العينة المراد دراستها. وعلى العموم هذا يحتاج إلى تحطيم العينة عن طريق تذويبها من قالب الكربون، مع أنه أحيانا ممكن فصلها عن طريق الطفو (Floatation)، وهناك طريقتان لعمل القوالب هما:

ا ـ قوالب أحادية الطور Single-stage replica

ب ـ قوالب ثنائية الطور Two-stage replica

وتتلخص طريقة القوالب أحادية الطور بتبخير ذرات الكربون على سطح ميكا جديد ونظيف، ومن ثم غمر صفيحة الميكا في ماء نظيف لكي يطفو الكربون فوق سطح الماء. ومن ثم فإن هذا الفلم الكربوني سوف يلتصق بالعينة المراد فحصها بطريقة القوالب.

أما طريقة القوالب ثنائية الطور فهي تتمثل في عمل فلم بلاستيكي سميك فوق السطح المراد فحصه، ومن ثم يمكن سحب هذا الفلم بسهولة، بعد سحب الفلم سوف تنطبع عليه صفات السطح المراد فحصه، ثم يغطى هذا الفلم بطبقة من الكربون المتبخر. عندئذ يذاب فلم البلاستيك تاركا خلفه الطبقة الكربونية وكذلك سطح العينة كاملا كما هو مبين بالشكل (١١ - ٤).



شكل ١١ - ٤. رسم تخطيطي يوضح طريقة عمل القوالب.

٤ ـ صبغ القطاعات الرقيقة جدا

تعتبر هذه الطريقة أكثر الطرق شيوعا واستعمالا بين المشتغلين في مجال المجهر الإلكتروني، وفيها يستعمل عدد كثير من التقنيات التحضيرية. وتعتبر أكثر الطرق مناسبة في علم الأحياء لمعرفة وملاحظة تراكيب الخلية المختلفة باستعمال قطاعات رقيقة منها. وضمن هذه الطريقة يمكن دراسة علم الأنسجة وكيمياء الأنسجة وكذلك كيمياء المناعة وغيرها. وقد تعطي طرق تحضيرات المجهر الضوئي بعض المعلومات الرئيسية اللازمة لصبغ القطاعات الرقيقة للمجهر الإلكتروني مثلا.

تحتاج القطاعات الرقيقة عادة لإجراء عمليات التثبيت (سواء كان بالتجميد الجاف Freeze drying أو باستعمال المثبتات الكيميائية) وربما التجفيف والطمر في وسط مناسب، ثم بلمرة وسط الطمر، ثم عمل قطاعات رقيقة [سمكها حوالي ٥٠٠ انجستروم(A°)]، ومن ثم صبغ هذه القطاعات بالصبغة المناسبة.

ومن الأصباغ المستعملة في هذا المجال ما يلي:
صبغات الرصاص (Lead stains) ، صبغات خلات اليورانيل (Uranyl acetate stains) ، الصبغة الثنائية (المزدوجة) (Double staining) وأصباغ سيتولوجية أخرى (Other cytological stains) .

١ ـ صبغات الرصاص

عند صبغ القطاعات في السوائل المحتوية على الرصاص ينتج عن ذلك قوة تباين عالية (Contrast) وتصطبغ معظم مكونات الخلية والأنسجة. هذه الصبغة واسعة الاستعمال إما بمفردها، أو بعد صبغ القطاعات بالخلات كصبغة روتينية للقطاعات الرقيقة (شكل ٩ ـ ٣).

ويجب ملاحظة أن صبغات الرصاص تتفاعل مع بقايا ثاني أكسيد الكربون مكونة كربونات الرصاص غير الذائبة، لهذا السبب يجب أخذ الاحتياط لمنع ذلك عن طريق

التخلص من آثـار ثاني أكسيد الكربون في الصبغة، وكذلك غسيل الصبغة. فالماء المقطر المستعمل لهذا الغرض يجب تحضيره وغليه لمدة عشر دقائق للتخلص من ثاني أكسيد الكـربون. كذلك يحفظ محلول الرصاص في أنابيب مغطاة بإحكام، وتمتص الصبغة باستعمال ماصة من تحت سطح الصبغة لتجنب حدوث أي تلوث. وهنا يفضل ترشيح سائل الصبغة باستعمال ورقة ترشيح خاصة صغيرة الثقوب (Millipore filter) (حجم ثقوبها ٠,٠٢٥ ميكرومتر).

وطريقة صبغ الشبكات النحاسية إما فرادى وذلك بطفوها على نقطة من محلول الصبغة في حوض بترى مغطى أو بتحميل عدد من الشبكات على حلقات صغيرة من أنبوبة مطاطية نظيفة وصبغها جميعا في أنبوبة مغطاة. بعد وضع القطاعات في الصبغة المدة الزمنية المناسبة تغمر القطاعات مباشرة في ماء مقطر نظيف خال من ثاني أكسيد الكربون، كذلك ممكن غمر القطاعات بسرعة في محلول مخفف من (٠,١ عيارى) هيدروكسيد الصـوديوم للتخلص من الصبغـة الـزائـدة. وجدير بالذكر أن مركبات الرصاص سامة جدا، لذا يجب التخلص من بقايا محلول الصبغة بصبه في الحوض.

وهناك طرق عديدة استخدمت فيها هذه الصبغة منها:

ا ـ **طريقة كارنوفسكى Karnovsky (1961)**

١ ـ أضف زيادة من أحادى أكسيد الرصاص إلى ١٥ ـ ٢٠ مل من محلول واحد عيارى هيدروكسيد الصوديوم في قمع، سخن الخليط قليلا (١٥ ـ ٢٠ دقيقة)، ثم برد بسرعة.

٢ ـ رشح، ثم احفظ الرشاحة في قنينة مغطاة. هذا المحلول يمكن حفظة لعدة أشهر.

٣ ـ خفف سائل الرشاحة إما بنسبة ١ : ٥٠ أو ١ : ١٠٠ بالماء بالمقطر، رشح قبل الاستعمال.

٤ ـ اصبغ القطاعات كما سبق وصفه.

ب ـ طريقة ميلوننج باستعمال طرطرات الرصاص (Milloning (1961

١ ـ حضر محلول يحتوي على ١٢,٥ جم هيدروكسيد الصوديوم، ٥ جم طرطرات الصوديوم البوتاسيومية (Potassium sodium tartrate, KNa $C_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$)

٢ ـ أضف $\frac{1}{2}$ مل من هذا المحلول إلى ١٠٠ مل باستعمال الماء المقطر، سخن ومن ثم أضف ١ جم من هيدروكسيد الرصاص. برد ثم رشح. الرشاحة (ذات الأس الهيدروجيني حولي ١٢,٣) لابد وأن تكون نقية وخالية من الترسبات، ويمكن حفظها لعدة أسابيع عند درجة حرارة الغرفة.

٣ ـ أصبغ القطاعات كما سبق وصف ذلك، ويحبذ أن تصبغ قطاعات الراتنجات لمدة ٥ ـ ٢٠ دقيقة، أما قطاعات أكريلات المثيل لمدة ٥ ـ ١٠ دقائق.

جـ ـ طريقة رينولد باستعمال سترات الرصاص (Reynolds 1963)

١ ـ اخلط ١,٣٣ جم نترات الرصاص مع ١,٧٦ جم سترات الرصاص و٣٠ مل ماء مقطر في دورق سعة ٥٠ مل. اخلط جيدا لمدة دقيقة ثم اتركه لمدة ثلاثين دقيقة (الخليط سوف يصبح حليبي الشكل).

٢ ـ أضف ٨ مل من ١ع هيدروكسيد الصوديوم ثم خفف المحلول المعلق الى ٥٠ مل بإضافة ماء مقطر. اخلط جيدا، هذا الخليط ثابت وممكن حفظه لمدة تصل إلى ستة أشهر في قنينة مغطاة، ولابد من ترشيحه باستعمال ورق ترشيح ذات ثقوب صغيرة (Millipore filter) قبل استعماله.

٣ ـ اصبغ القطاعات كما سبق وصفه وعادة قطاعات الراتنجات تحتاج إلى زمن من ٥ ـ ٣٠ دقيقة لصبغها بينما قطاعات أكريلات المثيل فتحتاج إلى ٣ ـ ١٠ دقائق، وإذا حدث أن كانت الصبغة داكنة فيمكن تخفيف هذا المحلول، إما بنسبة ١ : ٥٠ أو ١ : ١٠٠ بإضافة ٠,٠١ع هيدروكسيد صوديوم، ثم تغسل القطاعات بعد صبغها بالماء المقطر الخالي من ثاني أكسيد الكربون.

٢ ـ صبغات خلات اليورانيل Uranyl Acetate Stains, $(CH_3COO)_3UO_2 2H_2O$

تستعمل هذه الصبغة بشكل واسع وروتيني إما منفردة أو قبل صبغة الرصاص. وتعتبر من الصبغات الجيدة التي تعطي قوة توضيح أعلى وكذلك تعتبر مناسبة لقوى التبيين والتكبير العالية (High resolution work). ولابد من العناية والتأني عند استعمال محاليل تحتوى على اليورانيوم، لما لهذه المادة من خاصية إشعاعية وسمية. ومحلول خلات اليورانيل يتأثر بالضوء، لذا يجب حفظه في مكان مظلم خلال عمليات التخزين والصبغ، وكذلك لابد من الترشيح باستخدام أوراق ترشيح صغيرة الثقوب (Millipore filter) أو عمل طرد مركزي لمحلول اليورانيل قبل استعماله للصبغ. وعادة تصبغ القطاعات الرقيقة باليورانيل هذا، مع العلم أنه يمكن استعمال هذه الصبغة ضمن عمليات التثبيت وللعينة الكلية.

تصبغ خلات اليورانيل الحموض النووية والبروتينات ويستعمل عدد من محاليل هذه الصبغة باستعمال مذيبات مختلفة منها:

ا ـ محلول خلات اليورانيل الكحولي Alcoholic solutions of uranyl acetate

يمكن استخدام عدة محاليل لخلات اليورانيل لعمليات صبغ القطاعات الرقيقة، وعادة محاليل اليورانيل الكحولية من أفضلها لما لها من مميزات نفاذية عالية للقطاعات أكثر مما هو عليه الحال في محاليلها المائية.

وبمقدورنا تحضير صبغة اليورانيل باستخدام محلول مشبع من اليورانيل في ٥٠٪ كحول إثيلي، صبغ القطاعات يحتاج إلى مدة تتراوح ما بين ١٥ ـ ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة الغرفة. هذا مع العلم أنه ربما تحتاج بعض القطاعات الراتنجية الرقيقة جدا (Ultrathin resin sections) إلى زمن أطول للصبغ قد يصل إلى ٩٠ دقيقة أو أحيانا تزاد درجة الحرارة إلى مدى ٤٠ ـ ٧٠°م. هذا مع العلم أنه أخيرا استخدمت صبغة اليورانيل المشبعة في الميثانول الجاف (حوالي ٣٠٪) (Stempack and Ward 1964) ووجد أنها تحتاج لوقت أقصر للصبغ ما بين ١٠ ـ ٢٠ دقيقة للقطاعات الرقيقة عند درجة حرارة الغرفة. ومساوىء هذه الصبغة الأخيرة هو ما للميثانول من قدرة على إذابة فلم

السلويدين التدعيمي الذي ربما يستخدم لتدعيم القطاعات. وتغسل القطاعات بعد صبغها في كلا الحالتين بنفس محلول إذابة الصبغة لكي نتخلص من الصبغة الزائدة.

ب ـ محلول خلات اليورانيل المائي Aquous solution of uranyl acetate

محلول خلات اليورانيل المائي هو الآخر واسع الاستعمال، مع العلم أنه يحتاج لوقت أطول لعمليات الصبغ منه في حالة محاليل الكحول لكي نحصل على قوة تباين (contrast) عالية. وتحضر هذه الصبغة بعمل محلول مشبع من الخلات في ماء مقطر (٠,٥ ـ ١٪) وعادة تصبغ القطاعات الرقيقة لمدة تزيد عن ثلاثين دقيقة عند درجة حرارة الغرفة، ولكن وجد أن رفع درجة الحرارة ما بين ٤٠ ـ ٧٠°م سوف يقلل وقت الصبغ الذي نحتاجه.

هذا مع العلم بأن مادة خلات اليورانيل المغنيسية (Magnesium uranyl acetate) أكثر ذوبانا في الماء منها في خلات اليورانيل ولذا تستخدم أحيانا في عمليات الصبغ. لقد استخدم العالمان فراسكا وباركس (١٩٦٥) (Frasca & Parks 1965) محلول ٧,٥٪ من هذه المادة في الماء، ووجدا أنها تصبغ جيدا القطاعات الرقيقة إذا تركت فيها ثلاث ساعات عند درجة ٤٠°م. ومن محاسن هذا المحلول أنه أكثر ثباتا وأقل حموضة منه في المحلول المائي لخلات اليورانيل، ويمكن حفظه لعدة أشهر في الظلام عند درجة حرارة الغرفة.

جـ ـ طريقة صبغ العينات (المكعبات) بخلات اليورانيل
A procedure for block staining with uranyl acetate

لقد وجد عدد كبير من العلماء والباحثين المشتغلين في مجال المجهر الإلكتروني بما فيهم (Nass *et al.* 1965, Hayat 1969 and Glauert 1974) أنه من الأفضل صبغ قوالب العينـة، بخلات اليورانيل بعد عمليات التثبيت بالألدهيد والأوزميوم. كما وجد أن الصبغة تعمل على تثبيت الدهون الفسفورية (Phospholipids) والبروتينات وتجعلها أقل تأثراً بالكحول خلال عمليات التجفيف (Silva *et al.* 1966). وسوف نسرد الطريقة التي

نشرها العالم (Karnovsky 1967) لإجراء ذلك :

١ ـ تثبت العينة في محلول الدهيد مناسب، ثم يقطع قالب العينة إلى قطع صغيرة (قوالب ١ ـ ٢ مم) ثم تثبت بالمثبت الثاني وهو رابع أكسيد الأوزميوم .

٢ ـ تغسل قوالب العينة عدة مرات في محلول منظم (٠٥, ٠ جزيىء) من ماليات الصوديوم الهيدروجينية (Sodium hydrogen maleate) مع هيدروكسيد الصوديوم عند أس هيدروجيني ٢, ٥ (pH 5.2) لمدة ٣٠ دقيقة .

٣ ـ تصبـغ العينـات في محلول ٥, ٠ ـ ٢٪ خلات اليورانيل المذاب في محلول الغسيل المنظم (٠٥, ٠ جزيىء) لمدة ساعتين عند درجة ٤°م وفي الظلام .

٤ ـ تمرر العينات بسرعة في الكحول أو الاستون، ثم تطمر في أحد مواد الطمر الراتنجية .

٣ ـ طريقة الصبغة الثنائية (المزدوجة) Double Staining

تتم الصبغة الثنائية عادة بصبغ القطاعات أولا بخلات اليورانيل ثم تتلوها الصبغ بأملاح الرصاص، وغالبا ما تعطي هذه الطريقة قوة تباين أكثر من غيرها من الأصباغ الأنفة الذكر. ميزة هذه الصبغة يوضحها الشكل (٩ ـ ٣). تعتمد مدة الصبغة على سمك القطاعات المصبوغة ونوع الراتنج (البلاستيك) المستعمل، وعلى نوع النسيج المصبـوغ ودرجـة الحرارة، وكذلك على درجة التباين المطلوبة، فقوة التباين المطلوبة تعتمد على مقدار قوة التيار وفتحة العدسة الشيئية، وكذلك قوة التكبير المستعملة . هذا مع أن صبغ العينات لمدة ١٥ دقيقة في صبغة خلات اليورانيل المشبعة في الكحول عند درجة حرارة الغرفة واستعمال طريقـة رينولد (Reynolds, 1963) لصبغة سترات الرصاص ولمدة ٥ ـ ١٠ دقائق عند نفس درجة الحرارة تكون كافية، وسوف ينتج عنها قوة تباين جيدة. إن زيادة مدة الصبغ في خلات اليورانيل لزمن يصل إلى ٤٥ ـ ٦٠ دقيقة سوف يعطي قوة تباين أكبر، لذا فإنه من المفضل الكشف عن الزمن المناسب لصبغ نسيج ما . يجب ألا يغيب عن الذهن أن زيادة قوة التباين أفضل بكثير من إعطاء وقت أقصر للصبغة، مع العلم أن زيادة وقت الصبغة أكثر من اللازم ربما تؤدى إلى بعض التشـوهـات لمكونات الخلية عن حالتها النموذجية. وإذا أريد تطبيق الصبغة

الثنائية فإنه من الأصلح محاولة معرفة تأثير كل من الصبغتين على حدة لضمان أن كليهما يؤديان إلى نتيجة جيدة وزيادة في التباين.

وتتم عملية الصبغ باتباع الخطوات التالية:

١. يحضر محلول لكل من صبغة خلات اليورانيل المشبعة في الكحول وتحفظ في قنينة داكنة لحمايتها من تأثير الضوء وكذلك صبغة الرصاص حسب طريقة رينولد الآنف ذكرها. يمكن حفظ كلا المحلولين لمدة تصل إلى ثلاثة أشهر عند درجة حرارة الغرفة والأفضل هو ترشيح الجزء المراد استعماله من أي من الصبغتين قبل الشروع في عمليات الصبغ باستعمال ورق ترشيح ذي الثقوب الصغيرة.

٢. يحضر طبق بترى نظيف ذو غطاء يحتوي على ورقة الترشيح، ويفضل تبليل هذه الورقة بكمية من الكحول لكي يبقى الوسط مشبع أثناء الصبغ، ثم يقطع مربع مقاسه حوالي ٥×٥ سم من صفيحة شمع الأسنان (Dental wax) النظيفة ويعلم مكان الصبغ على صفيحة الشمع وتوضع على ورقة الترشيح ثم يغطى الطبق.

٣. ينقل محلول الصبغة بماصة نظيفة جدا ويوضع عدد من النقاط حسب الحاجة على لوح الشمع ثم يقفل غطاء الطبق.

٤. تلتقط الشبكات النحاسية باستعمال ملقط دقيق (Fine forceps) يرفع الغطاء ثم توضع الشبكات النحاسية بحيث تكون القطاعات ملامسة لسطح قطرة الصبغة. بعد ذلك يغطي الطبق. تكرر هذه العملية حتى يكمل العدد المراد صبغه من الشبكات النحاسية. ويحبذ أن يكون الطبق بعيدا عن ضوء الشمس المباشر.

٥. أما العينات في صبغة اليورانيل، فيحضر لها طبق بترى آخر، ويوضع في قاعة ورق ترشيح ثم توضع قطعة مربعة من لوح شمع الأسنان كما سبق وصفه في خطوة (٢) توضع بعض من قطع هيدروكسيد الصوديوم في الطبق وبجانب لوح الشمع لكي نخلص جو الصبغ من ثاني أكسيد الكربون. تبلل ورقة الترشيح بالماء المقطر بدلا من الكحول وتنقل صبغة الرصاص بماصة نظيفة وتوضع منها نقاط على لوح الشمع مباشرة كما في الخطوة (٣) ومن ثم يغطى الطبق.

٦ ـ عند إنتهاء مدة صبغ القطاعات بصبغة خلات اليورانيل، تلتقط القطاعات

بالملقط الرفيع، ثم تغمس في محلول الكحول لبعض الوقت، ثم تغسل القطاعات برفق في ماء مقطر خال من ثاني أكسيد الكربون. تجفف برفق باستخدام حافة ورقة ترشيح، ثم تنقل الشبكات إلى الصبغة الثانية (سترات الرصاص) بحيث تلاصق القطاعات نقاط الصبغة كما ذكر في الخطوة (٤). تعاد نفس الطريقة على جميع الشبكات النحاسية المراد صبغها وتترك الشبكات على الصبغة لمدة عشر دقائق تقريبا.

٧. عند انتهاء مدة الصبغة الثانية، تنزع الشبكات بالملقط الدقيق وتغسل بتيار مائي خفيف من زجاجة الغسيل (Washing bottle). تجفف الشبكات، ثم توضع على ورقة ترشيح نظيفة موضوعة في طبق بترى بحيث تكون القطاعات إلى أعلى.

هذا وهناك طريقة أخرى لإجراء نفس خطوات العمل الآنفة الذكر وهي:

١ ـ عمل حلقات من أنبوبة مطاطية سمكها حوالي ١ سم وسمك جدارها متوسط، وقطرها حوالي ٢ سم، وبمساعدة شفرة تعمل عدد من الشروخ المتباعدة على طول محيط هذه الحلقة.

٢ ـ تثبيت الشبكات النحاسية المحملة بالقطاعات في شروخ الحلقة المطاطة مع محاولة أن يكون الجزء الخالي من القطاعات في الشبكة النحاسية داخل الشرخ. وعادة يوضع ما بين ٥ ـ ٧ شبكات نحاسية في كل حلقة.

٣ ـ يرشح حوالي ٢ مل من صبغة خلات اليورانيل الأنف تحضيرها باستخدام ورق ترشيح صغير الثقوب، وتوضع في أنبوبة زجاجية نظيفة جدا.

٤ ـ تنقل الحلقات المطاطية المحملة بالشبكات إلى الصبغة، وتوضع بعيدا عن ضوء الشمس المباشر (عادة مدة الصبغة ما بين ٢٥ ـ ٣٠ دقيقة).

٥ ـ ترشح صبغة الرصاص كما في الخطوة الثالثة، بينما القطاعات في صبغة اليورانيل.

٦ ـ تغسل الزيادة من صبغة اليورانيل بعدة محاليل من الكحول (الميثانول مثلا).

٧ ـ تنقل الحلقات إلى صبغة الرصاص ومدة الصبغ عادة من ٥ ـ ٨ دقائق.

٨ ـ تغمر الحلقات في محلول مخفف جدا من هيدروكسيد الصوديوم (١ , ٠ عياري) لمدة قصيرة جدا.

٩ ـ تغسل القطاعات في الماء المقطر النظيف، وتنتزع بالملقط الدقيق الشبكات بلطف من مواقعها على الحلقات، ثم تغسل بتيار خفيف من الماء المقطر، ثم توضع على ورقة ترشيح نظيفة داخل طبق بترى بحيث تكون القطاعات على سطح الشبكة النحاسية.

٤ ـ صبغات سيتولوجية أخرى Other Cytological Stains

يعتبر معدني اليورانيوم والرصاص أكثر المعادن الثقيلة استعمالا في صبغ القطاعات الرقيقة. هذا مع وجود عدد من العناصر التي تعتبر جيدة وتعطي قوة تباين كافية عند استخدامها في محاليل الأصباغ، وعدد هذه العناصر يزداد مع الزمن، ومن هذه العناصر نذكر الاوزميوم والتنجستن والمغنيسيوم والكروم والفاناديوم والموليبدينم.

وسوف نشرح بعض من طرق الصبغ التي يستخدم فيها أحد العناصر الآنفة الذكر:

ا ـ رابع أكسيد الأوزميوم Osmium tetraoxide

تصطبغ الأنسجة عند تثبيتها في رابع أكسيد الأوزميوم. قوة التباين التي يمنحها هذا المثبت كافية في حالة الطمر في مادة الميثااكريلات (Methacrylate). ولكن قوة التباين هذه ليست كافية عند طمر العينات في مادة الأيبوكسي، ولذا يلزم صبغ القطاعات بصبغات إضافية (Finck 1960). كما أن الطريقة القديمة لإيضاح جهاز جولجي على مستوى المجهر الضوئي كانت تتم بتثبيت العينة لمدة طويلة في رابع أكسيد الأوزميوم، ولقد تطورت هذه الطريقة وأصبحت تناسب أيضا المجهر الإلكتروني.

ب ـ حمض التنجستيك الفوسفورى Phosphotungstic acid (PTA)

استعمال محاليل مركزة من حمض التنجستيك الفوسفورى (PTA) في الكحول ولمدة طويلة يعمل على فصل أو تحطيم كثير من مكونات الخلية، ولكنه مفيد لدراسة بروتينات الألياف (Huxley 1957). صبغ الأنسجة في محاليل مخففة منه ولمدة أقصر سوف ينجم

عنه تأثير أقل على فصل وتحطيم مكونات الخلية، وهذا مفيد في دراسة مكونات الخلية الأخرى. أما إذا صبغت العينات قبل الطمر فإن هذه المادة (PTA) سوف تعمل على زيادة صلابة قوالب العينات مما يعيق عمليات القطع، بل ربما تحدث عمليات إنفجار إذا ما استخدمت مادة أوكسيد البروبلين في عمليات الطمر. الجدير بالذكر أن الـ PTA في وقتنا الحاضر أصبح نادر الاستعمال كصبغة روتينية.

جـ - برمنجنات البوتاسيوم Potassium permanganate

لقد استخدم العالم لفت عام ١٩٥٦ (Luft 1956) هذه المادة كمثبت وصبغة في نفس الوقت. فإن تثبيت العينة لمدة ساعتين في ٣٪ محلول برمنجنات معدل بمنظم خلات الفيرنول عند الأس الهيدروجيني ٧,٤ سوف يعطي تثبيتا جيدا ويصبغ التراكيب الغشائية والأجسام السيتوبلازمية الداكنة (الليسوسومات)، ولكن ينتج صبغة باهتة جدا مع مكونات الخلية الأخرى من نواة وتراكيب سيتوبلازمية. برمنجنات البوتاسيوم هي المادة الأخرى القليلة الاستعمال لتثبيت وصبغ العينات الحيوانية، نظرا لما تحدثه من تحطيم لمكونات الخلايا، ولكن ربما تستخدم في مجال المواد النباتية، وطريقة الصبغ كما يلي:

١ - تقطع بعض القطاعات الرقيقة وتوضع فوق شبكة نحاسية نظيفة.

٢ - يحضر، مباشرة وقبل عملية الصبغ، محلول ٢,١٪ برمنجنات البوتاسيوم في الماء المقطر المغلي.

٣ - تصبغ القطاعات لمدة ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة الغرفة عن طريق طفو الشبكات النحاسية على قطرات من الصبغة الموضوعة على قطعة من شمع الأسنان النظيف.

٤ - تغسل، مباشرة بعد الصبغ، الشبكات النحاسية في محلول حديث التحضير من ١ : ١٠٠ محلول قاصر بال (Pal's bleach) (٥٪ كبريتيت البوتاسيوم Potassium sulphite في ٥٪ حمض الأوكساليك المائي Aqueous oxalic acid).

٥ - تغمر الشبكات جيدا في الماء المقطر.

صبغ القطاعات السميكة للمجهر الضوئي

Staining thick plastic sections for light microscope

لقد سبق وصف تحضير القطاعات السميكة في الجزء الخاص بالتقطيع. غالبا ما يكون ضروريا فحص هذه القطاعات البلاستيكية السميكة (٢, ٠ - ٢ ميكرومتر) التي نحصل عليها من قوالب عينات حضرت للمجهر الإلكتروني، بوساطة المجهر الضوئي. فالقطاعات السميكة تكون نافعة عندما نريد مثلا اختيار منطقة ما من عينة النسيج الكبيرة المطمورة وكذلك عندما نريد دراسة قطاعات متتالية في مناطق مختلفة من العينة. فحص هذه العينات يتم بدون صبغ باستعمال المجهر ذى الأطوار المتباينة، ولكن الأفضل هو صبغ هذه القطاعات. هناك عدة طرق سريعة لصبغ هذه القطاعات والحصول على درجات مختلفة من الصبغ لبعض مكونات هذه الأنسجة (شكل ١١ - ٥). وطريقة العمل المناسبة والمزكاة هي كما يلي:

١ - تنقل القطاعات إلى قطرة من ٢٠٪ أستون على شريحة زجاجية نظيفة.

٢ - تسخن بلطف على صفيحة ساخنة أو على لهب هادىء جدا والغرض من ذلك هو جعل القطاعات تنبسط، وتجف (ملاحظة: لا يسمح للأسيتون بالغليان ويمكن استخدام الفرن العادي عند درجة ٦٠°م).

٣ - تغمر القطاعات بقطرة من محلول الصبغة وتسخن بلطف لمدة تتراوح ما بين ٣٠ ثانية إلى دقيقتين. كذلك يجب الحذر من أن يغلي محلول الصبغة.

٤ - يسكب المحلول الزائد من الصبغة ثم تغسل القطاعات بالماء المقطر، تجفف في مكان دفيء وبلطف.

هذا ومن محاليل الصبغات الصالحة للاستعمال ما يلي:

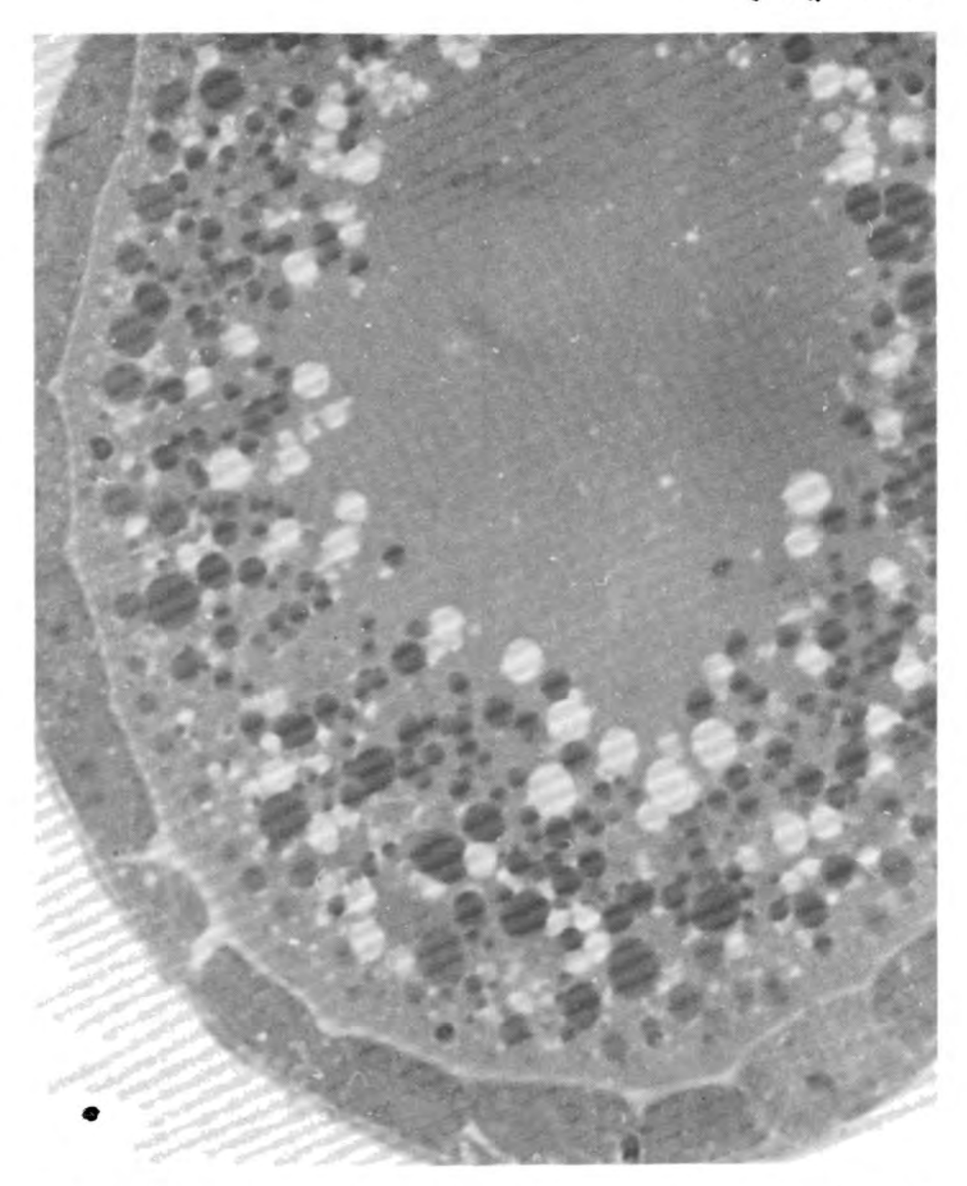
ا - ١٪ أزرق الميثيلين (Methylene blue) مع ١٪ آزور ٢ (Azur 2) في ١٪ بوراكس (Borax) (Richardson *et al.* 1960).

ب - ١٪ أزرق التلويدين (Toluidine blue) و١٪ آزور ٢ في ١٪ بوراكس (Richardson *et al.* 1960).

جـ - صبغة باراجون (Paragon stain) (Martin *et al.* 1966).

د - ١٪ فيوشين قاعدي (Basic fuchin) في ٥٠٪ أسيتون (Winkelstein *et al.* 1963).

٥ ـ توضع قطرة من مادة الطمر البلاستيكية ثم تغطى بغطاء شريحة نظيف للاحتفاظ بها دائما.



شكل ١١ ـ ٥: صورة بالمجهر الضوئي لقطاع في بيض حشرة سوسة الحبوب المثبتة للمجهر الالكتروني ومطمورة في مادة الراتنج.

الفصل الثاني عشر

المجهر الإلكتروني المساح

● مقدمة ● طرق تحضير العينات
● بعض الاحتياطات في تحضير العينات
● عملية نزع الماء ● عمليات ما بعد نزع الماء ● المميزات العامة

مقـــدمة

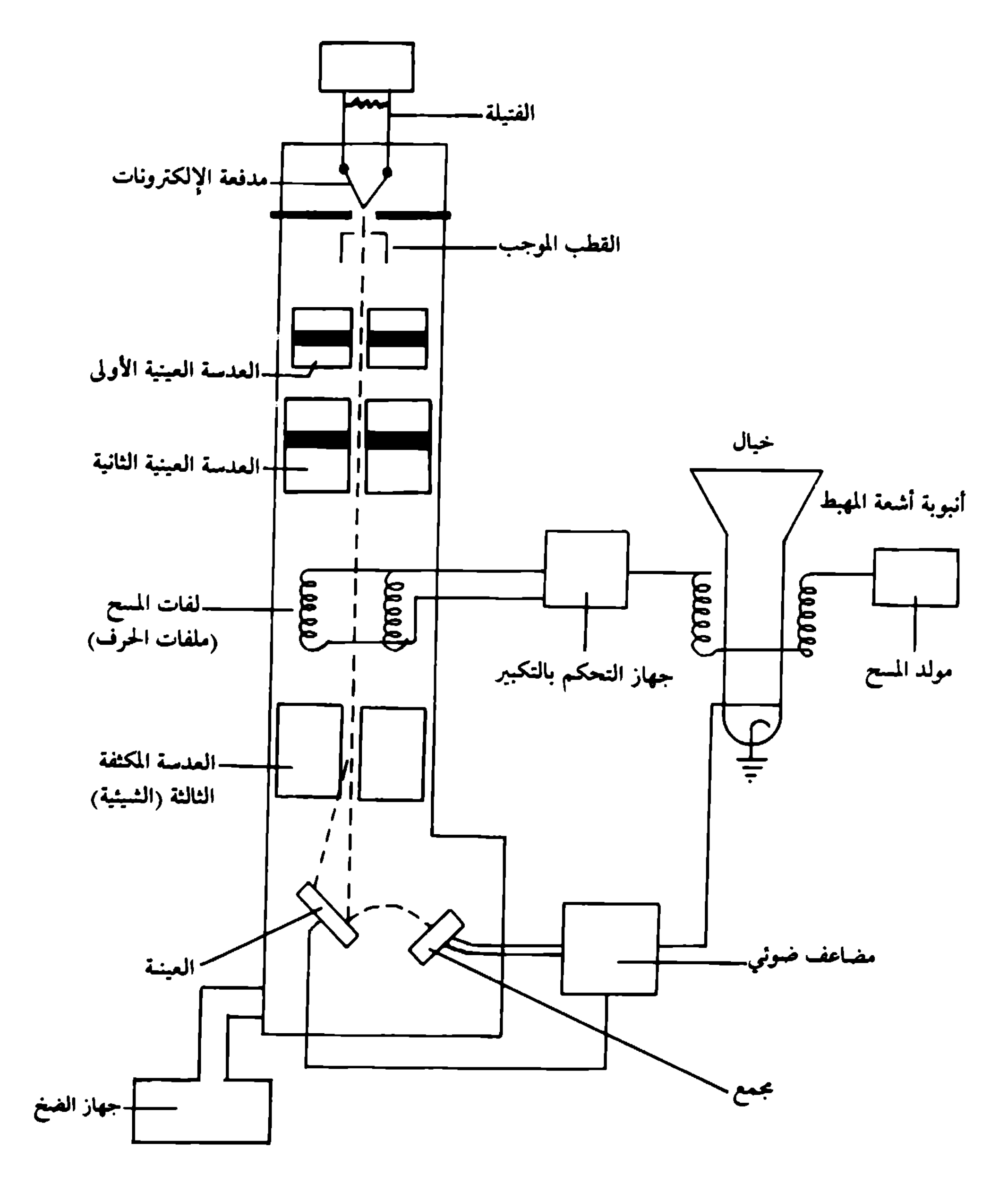
في المجهر الإلكتروني السابق وصفه تنفذ أشعة الإلكترونات خلال العينية، وترى الصورة تقريبا كما هو الحال في المجهر الضوئي، وهذا النوع يسمى بالمجهر الإلكتروني النفاذ. ونفاذية الإلكترونات ليست هي الطريقة الوحيدة المستعملة في إضاءة المجاهر الإلكترونية، فالمجهر المساح تتكون فيه الصورة بطريقة مختلفة عما هي عليه في النفاذ. الصفة الرئيسية المميزة في هذا النوع من المجاهر أنه تستخدم فيه حزمة ضيقة من الإلكترونات لتمسح العينة، أي أن الالكترونات تتحرك للامام والخلف ماسحة سطح العينة، كما أن العينة تتسبب في عكس الالكترونات. يطلق على هذه الإلكترونات بالإلكترونات الثانوية، ويمكن استخدامها لإنتاج الصورة.

لقد استخدم المجهر المساح على نطاق واسع وتجاري عام ١٩٦٥م، ومنذ ذلك الوقت أصبح لهذا النوع من المجاهر (شكل ١٢ ـ ١) دور بارز في عمل الأبحاث الحيوية والجيولوجية والصناعية، هذا ويعتبر عمل مجهر المسح الإلكتروني مكملا لعمل المجهر الإلكتروني النفاذ.



شكل ١٢ ـ ١ : المجهر الالكتروني المساح من نوع (JSM-35C). (الصورة من شركة جيول)

يوضح الرسم التخطيطي (شكل ١٢ ـ ٢) الشكل العام للمجهر الإلكتروني المساح. يشبه عمود هذا المجهر ذلك الموجود في المجهر الالكتروني النفاذ، ولكنه أبسط، ويحتوى على الأدوات المنتجة لأشعة الإلكترونات فقط والمستعملة لمسح العينة المراد فحصها. هذه المكونات تتمثل في مدفعة الإلكترونات والتى تشبه تلك الموصوفة آنفا في المجاهر الإلكترونية النفاذة. أما العدسات الإلكترونية فتتمثل في العدسات المكثفة للإكترونات والتي تقوم بنفس الغرض السابق وصفه في حالة المجاهر الإلكترونية النفاذة وهي تكوين حزمة ضيقة جدا من أشعة الإلكترونات. يصل القطر الحقيقي لبقعة المسح الإلكتروني حوالي ٥ نانومترات. والجدير بالذكر أن عدسات جهاز تكثيف الأشعة الإلكترونية عبارة عن عدسات كهرومغنيطية تشبه، إلى حد كبير، تلك العدسات المكثفة المستعملة في المجاهر الإلكترونية النفاذة. كما يضاف إلى ذلك مجموعة من الملفات الحارفة (Deflecting coils) مع دائرة مناسبة، تتسبب في جعل الشعاع



شكل ١٢ ـ ٢ : رسم تخطيطي يوضح التخطيط العام للمجهر الالكتروني الماسح .

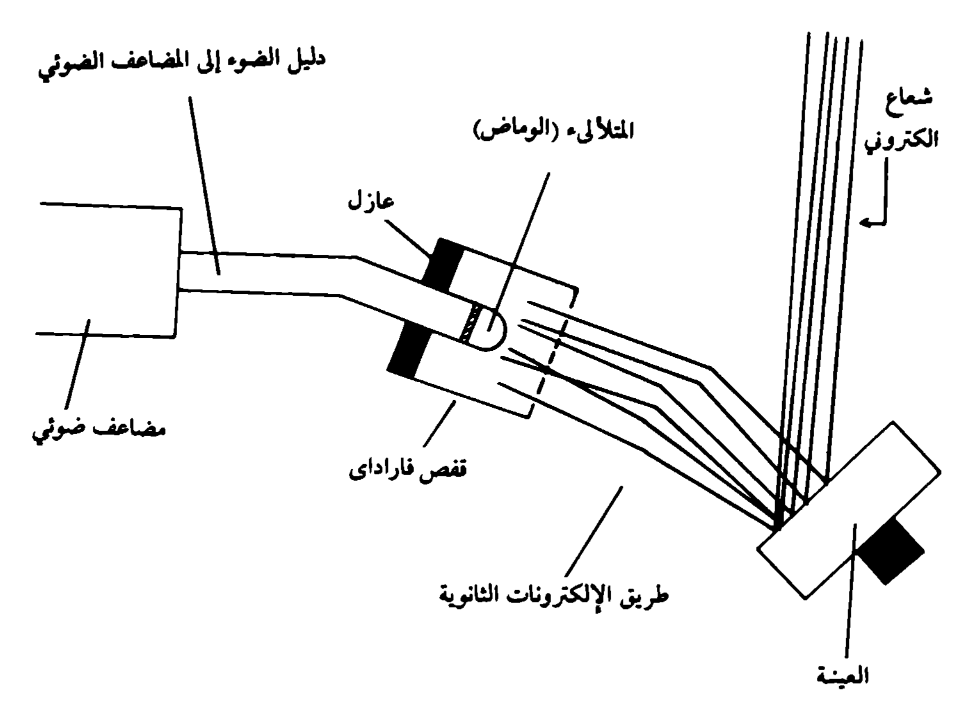
يمسح العينة، وهذا يسهل عملية التحكم في مسح جزء معين من العينة وتقدير معدل وعدد خطوط المسح للسنتيمتر الواحد.

عمـود المجهر المساح مفرغ تماما كما هو الحال في حالة عمود المجهر الإلكتروني النفاذ. أما مسرح العينة (Specimen stage) وملحقاته من أجهزة تحريك وإمالة العينة (tilting) فتوجد عند قاعدة عمود المجهر.

الإلكـترونات الثانوية المنطلقة (Emitted) من العينة هي نتيجة للإشعاع الذي يصلها من أشعة الإلكترونات الصادرة من مدفعة الإلكترونات، وهذه الإلكترونات الثانوية سوف ينتج عنها خيال العينة. يتم تكون الخيال بمساعدة جهاز يسمى بالمجمع (Collector) (شكل ١٢-٣). هذا المجمع يتكون من قفص فاراداى (Faraday cage)، وهو عبارة عن كأس معدني ذات شحنة كهربائية موجبة وتغطي قمتها بشبكة معدنية تلعب دورا في تنظيم مرور الإلكترونات.

الإلكترونات المنبعثة عن العينة تنجذب في اتجاه قفص فاراداى ويخترق بعض منها الشبكة المعدنية، وفي داخل هذا القفص توجه هذه الإلكترونات بوساطة فولطية موجبة عالية باتجاه آداة تعرف بالجهاز الوماض (التلألىء) (Scintillator) والذي بدوره يحول الطاقة الحركية (Kinetic energy) للإلكترونات إلى ضوء مرئى. هذا الضوء يغذى إلى مضـاعف ضوئى (Photomultipier) والـذي بدوره يحولـه إلى تيار كهربائي يستعمل لضبط تركيز أشعة أنبوبة المهبط (Cathode rays tube).

أي اختلاف في كثافة الإلكترونات الثانوية المنبعثة عن العينة يظهر كتغير في بريق (Brightness) ذلك الجزء من العينة على شاشة الفحص. وعلى هذا فإن الخيال يتشكل من نقطة إلى نقطة، ومن خط إلى خط كما هي الحال عليه في خيال شاشة التلفاز، هذا الخيال يمكن رؤيته مباشرة على الشاشة أو يمكن تصويره على ألواح أو أفلام حساسة.



شكل ١٢ ـ ٣: رسم تخطيطي يوضح جهاز المجمع في المجهر الإلكتروني المساح.

تعتمد قدرة التبيين (Resolving power) في المجهر المساح على عدة عوامل منها حجم نقطة أشعة الإلكترونات التي تمسح العينة، وكذلك طبيعة العينة المفحوصة والطريقة التي تتداخل فيها أشعة الإلكترونات، وسرعة المسح، وعدد الخطوط في الخيال المتكون، وعلى العموم فإن قدرة التبيين في هذه المجاهر تصل إلى ١٠ نانومترات في الأحوال الجيدة والمناسبة. وبهذا فإن خصائص المجهر الإلكتروني المساح تختلف كثيرا عن المجهر الإلكتروني النفاذ، فالمجهر النفاذ يمتاز بقوة تبيين عالية. وبذلك فهو جهاز صالح لدراسة التراكيب الخلوية الدقيقة، وكذلك تركيب بعض الكائنات الحية الدقيقة من فيروسات وبكتريا وغيرها، ولكن يجب أن تكون قطاعات العينة رقيقة جدا. هذه القطاعات الرقيقة من الصعوبة بمكان الحصول منها على صور ثلاثية الأبعاد بالمجهر المساح. لذلك فالمجهر المساح يناسب دراسة اسطح العينات الصلبة مع إعطاء بعض المعلومات البسيطة عن تركيبها الداخلي. وعلى العموم قوة تبيين المجهر المساح أقل من

قوة تبيين المجهرالنفاذ، ولكن يمكن القول أن هذين النوعين من المجاهر يكمل بعضهما الآخر.

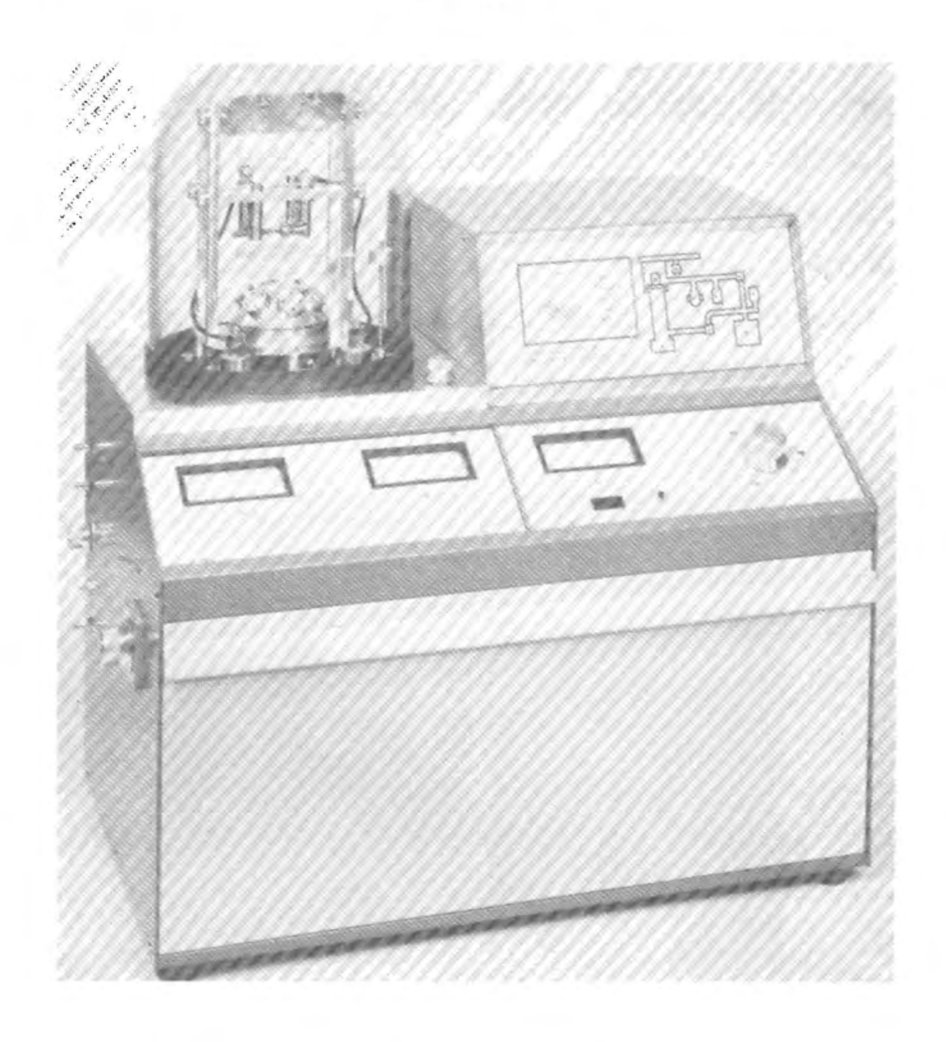
طرق التحضير

نظرا لأن عمود المجهر مفرغ تماما، فإنه لابد وأن تكون العينة المراد فحصها جافة. تلك العينـات التي تمتـاز بقلة محتواها المائي مثل حبوب اللقاح والبذور والدياتومات وأصداف المنخريات (Foraminferan shell) وجدران خلايا النبات السميكة، وجدار جسم الحشرة، تحتاج إلى تحضيرات بسيطة نظرا لعدم تأثر سطحها عند وضعها في مكان مفرغ. لكن دراسة العينات اللينة أو بعض التراكيب الداخلية تحتاج إلى طرق تحضير خاصـة، لهذا يعتمد نوع التحضير على طبيعة العينة. بعض العينات يمكن تثبيتها بنجاح ومن ثم تجفيفها بالطرق الكيميائية. كما يستعمل في حالات تحضيرات المجاهر الضـوئية. عينـات أخـرى يمكن طمـرها في الشمع (Wax) أو الراتنج (Resin) ثم قطعهـا وفحصهـا بعـد إزالة مادة الطمر، ويمكن استعمال طريقة التجفيف المجمد (Freeze drying) أو نحت المتجمدات (Freeze etching). أما بالنسبة للعينات الطرية مثل الأوليات أو الخلايا المزروعة فهناك طرق خاصة للتجفيف يمكن استخدامها والتى يتجنب فيها استخدام المواد الكيميائية للتجفيف مثل الكحول الإثيلي والأسيتون.

بعد عمليات تثبيت وتجفيف العينة بأي من الطرق المذكورة آنفا، لابد من تغطية (Coating) العينة المراد فحصها بطبقة رقيقة من مادة موصلة كالكربون أو الذهب. يمنع هذا الغلاف تكون شحنات كهربائية وارتفاع درجة حرارة العينة خلال عمليات الفحص. تتم عملية تغطية سطح العينة في جهاز تبخير مفرغ (شكل ١٢ ـ ٤) لكي يتسنى وضع طبقة متناسقة ورقيقة من مادة التغليف.

بعض الاحتياطات في تحضير العينات

ويمكن ذكر بعض الاحتياطات الواجب اتباعها لتحضير عينات المجهر المساح:



شكل ١٢ ـ ٤ : جهاز التبخير المفرغ من نوع (P-150A) المستخدم لعمليات التظليل بالمعادن الثقيلة .
(الصورة عن شركة بولارون)

١ ـ حجم العينة Specimen size

يفضل عدم استخدام العينات الكبيرة نظرا لأنها رديئة التوصيل كهربائيا، وتحتاج إلى زمن أطول في المثبت، وكذلك صعوبة نزع سوائلها الداخلية خلال عمليات التجفيف الحرج. ويتراوح الحجم المناسب للعينة ما بين ٢ ـ ٦ مم٣ وتوضع على المسطبة (القطعة المعدنية الخاصة بحمل العينة Stub) (شكل ١٢ ـ ٥) بحيث يكون طرفها العريض ملامسا لها. كما يفضل عدم وضع عدد كبير من العينات الدقيقة مثل الكائنات الحية الدقيقة أو حبوب اللقاح على المسطبة لتفادى ظاهرة التراكم.



شكل ١٢ ـ ٥: مجموعة من المصطبات الخاصة بحمل العينات المعدة للفحص بالمجهر الإلكتروني المساح.

٢ ـ تنظيف العينة Specimen cleaning

تغطى سطوح معظم العينات سواء كانت صلبة أو ناعمة بعض المواد الخارجية مثل المـواد المخـاطية، الـدم، الليمف، السـائـل الخلوي، البقايا الخلوية، الصمـوغ، الشموع، والكبسولات الهلامية للبكتريا وغيرها. كما أن بعض الخلايا قد تكون محاطة بسوائل من مواد بروتينية أو عديدات التسكر. تعتبر المواد الآنف ذكرها مواد ملوثة وربما تسبب تكـون طبقـة مائلة على سطح العينة في المجهر المساح. إن عمليات التثبيت والتجفيف ربما تزيل جزءا من هذه المواد، ولكن المفضل والأحسن هو تنظيف هذه المواد قبل عمليات التثبيت.

ويمكن إزالة معظم تلك المواد من على سطح العينة عن طريق غمرها في محلول فسيولوجي مناسب (مثل: المحلول الملحي المتزن Saline) والذي يمنع انتفاخ العينة وانكماشها. ويفضل دائما أن تكون درجة حرارة سائل الغسيل مشابهة لدرجة حرارة الجسم الحي المغمور وفي الوسط المعيشي الملائم والمناسب.

سطوح العينـات الجـافـة مثل العظام والأوراق والسيقان وغيرها يمكن تنظيفها باستخدام الهواء أو الغاز، أما فراغات التجاويف لبعض العينات الحيوانية مثل الأمعاء والأوعية الـدمـوية والقلب وغـيرهـا فلابد من غسلها بسائل الغسيل، لكي نضمن التخلص من هذه المواد.

في حالات معينة تصعب إزالة هذه المواد العالقة لو غسلت بقوة (Vigorous)، لذلك لابد من هضمها بأحد الإنزيمات الملائمة مثل البابين (Papain)، الكيموتربسين (Chymotrypsin)، والتربسين (Trypsin) وغيرها.

وبـالإضـافـة إلى استخـدام الإنزيمات، يمكن استخدام بعض المنظفات مثل الحموض لتنظيف المواد العالقة، لكي نتمكن من فحص سطح العينة المراد فحصها. فمثلا يستخدم حمض الهيدروكلوريك لإذابة الطبقة الجيلاتينية حول الأهداب الحسية

في القنوات نصف الدائرية للأذن.

ويجب ألا يغيب عن الذهن الانتباه الشديد والعناية الفائقة بالعينة عند استخدام أي من الطرق السابقة لما قد تسببه تلك المعاملات من تغير في طوبوغرافية سطح العينة، إذ تعالج العينات بتلك المواد قبل تثبيتها. هذا وقد تحطم المعاملات الميكانيكية القوية سطح العينات اللينة أو الطرية. وفي الحقيقة، فإن غمر العينة في المحلول الملحي المتزن (Saline) ربما يغير في مظهر الخلايا المزروعة.

٣ ـ التثبيت Fixation

يفضل أن تتم عملية تثبيت العينة مباشرة بعد فصلها من الكائن الحي أو بعد تنظيفها وغسلها وعدم ترك العينة في وسط بيئى تختلف فيه كل من درجة الحرارة والأس الهيدروجيني بعد عزلها من الكائن الحي. ومن الجدير بالذكر أن حجم العينة المراد تثبيتها يكون أكبر فيما لو قورن بحجم العينات المستخدمة في حالة المجهر الإلكتروني النفاذ لأنه لابد وأن ينفذ المثبت إلى أعماق أنسجة العينة، ولكن ذلك أقل حرجا في المجهر المساح حيث أنه يتم فحص سطح العينة.

التثبيت النموذجي لعينات المجهر الإلكتروني المساح لا تختلف كثيرا عنه في المجهر النفاذ ما عدا ما يخص الأسموزية، حيث وجد أن الأسموزية النموذجية لتثبيتات المجهر المساح أقل مما يستعمل في المجهر النفاذ، والمفضل لمثبتات المجهر المساح أن تكون متساوية الضغط الأسموزى (متساوية التوتر) (Isotonic) نظرا لأن الغمر يتم لفحص سطح العينة فقط.

تركيز المثبت هو الآخر عامل مهم ومحدد في الحصول على نتائج جيدة وخاصة في العينات اللينة أو السهل تحطمها أو الخلايا الموجودة في معلق كخلايا الدم الحمراء. ويمكن استخدام عدد كبير من المثبتات الكيميائية لتثبيت عينات المجهر المساح وبالذات مع العينات البيولوجية وأكثرها استعمالا تلك المثبتات الشائعة الاستخدام في تحضيرات المجاهر الإلكترونية النفاذة. ومنها:

ا - ١ - ٢٪ رابع أكسيد الأوزميوم في ٠,٥ أو ١ جزيىء من محلول فوسفات الصوديوم أو كاكوديلات الصوديوم المنظم (الأس الهيدروجيني ٧,٢ - ٧,٤).

ب - ١,٥ - ٣٪ محلول جلوتر ألدهيد والمحضر في ٠,٥ أو ١ جزيىء من فوسفات الصوديوم المنظم أو كاكوديليت الصوديوم المنظم (الأس الهيدروجيني ٧,٢ - ٧,٤).

جـ - مثبت خليط (Cocktail fixative) وهذا عبارة عن خليط من مثبت الجلوترألدهيد ورابع أكسيد الأوزميوم، ويستخدم هذا المثبت لتثبيت وحفظ العينات البيولوجية اللينة. وعادة ١,٢٥٪ جلوترألدهيد و٢٪ رابع أكسيد الأوزميوم في ٠,١ جزيىء من محلول كاكوديليت الصوديوم المعدل (الأس الهيدروجيني ٧,٢ - ٧,٤) ويجرى التثبيت لمدة ١ - ٣ ساعات عند درجة ٤°م. وعادة تثبت العينة أولا بالجلوترألدهيد (مثبت أولى) يتبعه غمر العينة بمحلول غسيل معدل ثم تنقل إلى المثبت الثانوي رابع أكسيد الأوزميوم.

ينفذ كل من مثبتي الجلوترألدهيد ورابع أكسيد الأوزميوم إلى العينة ببطء، لذلك يجب دائما محاولة إعطاء وقت كاف لعملية التثبيت، فقد تصل مدة بقاء العينة في مثبت الجلوترألدهيد ما بين ٢٤ - ٤٨ ساعة أو أكثر وخلال هذه المدة يغير المثبت مرتين على الأقل.

كثير من الكائنات الحية وحيدة الخلية أو خلايا الدم أو الحيوانات المنوية حساسة لأسموزية المثبت المتسخدم، فمثلا كرات دم الثدييات إذا وضعت في محلول مثبت عالي التوتر (Hypertonic) فسوف يسبب إنكماشها وتتكون لها زوائد كالأشواك نتيجة لتقلصها (Shrinkage). وعلى العكس، إذا وضعت تلك الخلايا في محلول مثبت قليل التوتر (Hypotonic) سوف تنتفخ وتصبح دائرية بدلا من كونها مقعرة الوجهين. في هذه الحالات لابد من إضافة محلول منظم إلى المثبت، وكذلك معرفة تركيز المثبت حتى لا يؤثر ذلك على العينة المراد تثبيتها، وفي بعض الحالات يفضل إضافة السكروز إلى المثبت من أجل زيادة ضغطه الأسموزي.

وكثيرا ما يستخدم مثبت رابع أكسيد الأوزميوم في العينات التي تغطيها طبقة مثل جدار المعدة والأمعاء والقصبة الهوائية وغيرها، لما لهذا المثبت من قدرة على إزالة تلك الطبقة. وعلى العموم مدة التثبيت في مثبت الجلوترالدهيد المستخدم لتثبيت العينات البيولوجية تتراوح ما بين عدة ساعات إلى عدة أيام بعدها يغسل في محلول متساوى التوتر لمدة ٣٠ ـ ٦٠ دقيقة، ثم يثبت في رابع أكسيد الأوزميوم (المثبت الثانوى) لمدة ما بين ١ ـ ٣ ساعات عند درجة ٤°م.

عملية نزع الماء Dehydration

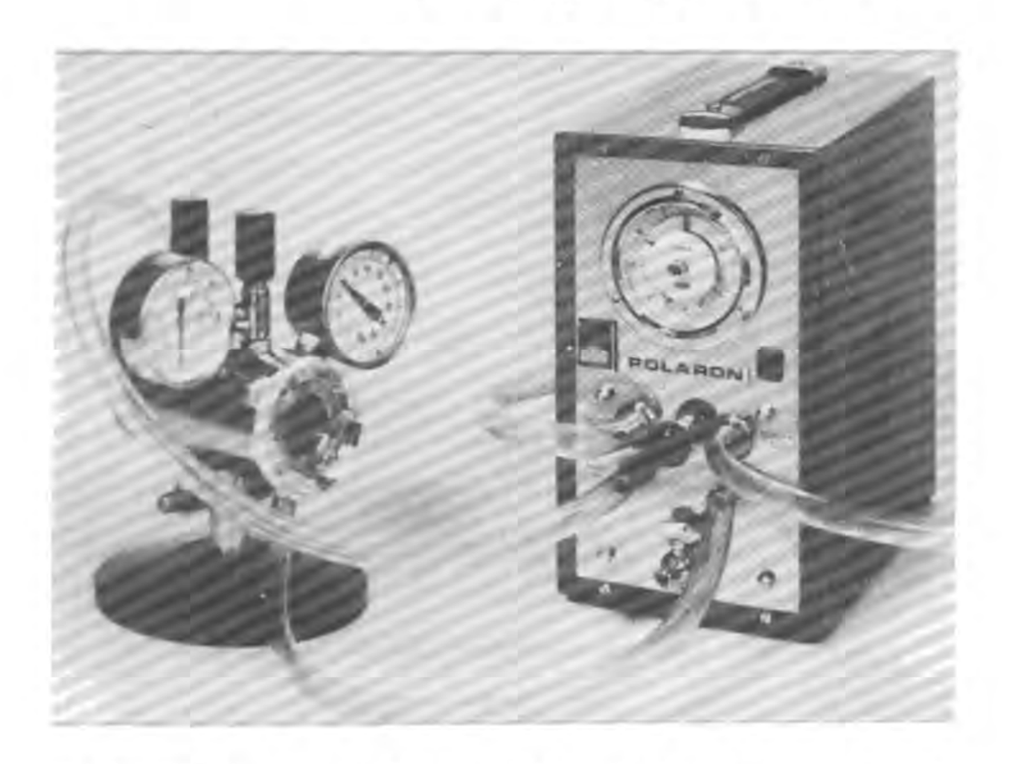
عملية نزع الماء يقصد بها تجفيف العينة المثبتة من خلال إمرارها في سلسلة من محلول الأسيتون أو الايثانول يتدرج تركيزها تصاعديا (٣٠٪، ٥٠٪، ٧٠٪، ٨٥٪، ٩٥٪) ولمدة خمس إلى عشر دقائق في كل تركيز. ومن ثم تنقل العينة إلى محلول مطلق من الاسيتون أو الميثانول لمدة ٣٠ ـ ٦٠ دقيقة، يغيّر خلالها المحلول عدة مرات. جرت العادة قديما على فحص الخلايا أو العينات بعد تجفيفها في الهواء الجاف أو الأسيتون أو الكحول، ولكن طريقة التجفيف المستعملة الآن هي طريقة النقطة الحرجة للتجفيف (Critical point method) والتي يستخدم فيها سائل ثاني أكسيد الكربون أو فريون ـ ١٣. وتتم طريقة النقطة الحرجة للتجفيف بإمرار العينة على الاسيتون أو الايثانول قبل نقلها إلى جهاز التجفيف للنقطة الحرجة.

طريقة التجفيف للنقطة الحرجة (نقطة التحول) Critical point drying

ادخل هذه التقنية في مجال المجاهر الإلكترونية العالم اندرسون (١٩٥١) (Anderson 1951) وتعتمد على تحول السائل إلى غاز دون أن يتأثر سطح العينة. هناك العديد من الأجهزة (Devices) المتوفرة تجاريا لإجراء طريقة التجفيف للنقطة الحرجة، مع العلم أنه يمكن عمل ذلك في الورشة.

الجزء الرئيسي لهذا الجهاز يشتمل على غرفة تجفيف العينة والتي يتم فيها احلال الاسيتون أو الكحول بثاني أكسيد الكربون (شكل ١٢ ـ ٦). غرفة العينة مزودة بغطاء

قابل للفتح ، لقياس ضغط سائل ثاني أكسيد الكربون الداخل إلى غرفة العينة وكذلك ضغط غاز ثاني أكسيد الكربون الخارج من هذه الغرفة .



شكل ١٢ ـ ٦ : جهاز تجفيف للنقطة الحرجة المستخدمة في تحضيرات المجهر الإلكتروني المساح . (الصورة من شركة بولارون)

يمر خلال غرفة العينة ماء الصنبور الساخن (درجة الحرارة ٤٠ ـ ٤٥°م) والذي بدوره يقوم بتسخين هذه الغرفة لكي تتم عملية النقطة الحرجة لسائل ثاني أكسيد الكربون (١٠٧٢ رطل/ بوصة مربعة و٣١°م) . توضع العينة في داخل غرفة التجفيف باستخدام أنبوبة أو وعاء معدني ذو غطاء مثقب أو كبسولات بلاستيكية مثقبة لكي تسهل إزالة سائل التجفيف (شكل ١٢ ـ ٧) . ويجب أن تنقل العينات المراد تجفيفها بطريقة النقطة الحرجة إلى غرفة التجفيف مع قليل من الكحول المطلق أو الاسيتون حتى لا تجف في الهواء قبل إجراء عملية التجفيف بهذه الطريقة . لابد أن يكون غطاء

غرفة العينة محكم وأن يسمح لسائل ثاني أكسيد الكربون بالنفاذ إلى الغرفة من اسطوانة الغاز. ينتج عن هذا ارتفاع الضغط في غرفة العينة إلى أن يصل إلى الثبات عند حوالي ٩٠٠ رطل / بوصة مربعة. بعد ذلك يفتح تدريجيا صمام التفريغ (exit valve) ويسمح لسائل ثاني أكسيد الكربون بالخروج ببطء من الغرفة ولمدة ٢ ـ ٣ دقائق، ثم يقفل كلا الصمامين، صمام دخول (Inlet valve) سائل ثاني أكسيد الكربون وصمام خروج (Exit valve) ثاني أكسيد الكربون. وتترك الغرفة معرضة لثاني أكسيد الكربون لمدة ٥ دقائق، ثم يسمح لسائل ثاني أكسيد الكربون بالمرور من جديد إلى الغرفة لمدة من دقيقة إلى دقيقتين. بعدها يقفل الصمام لمدة ٥ دقائق. هذه العملية الآنف ذكرها يمكن إعادتها من خمس إلى ست مرات. بعد ذلك تغمس الغرفة في وعاء يحتوي على ماء صنبور ساخن لكي يرفع درجة الحرارة إلى حوالي ٤٠°م، وهذه الدرجة كافية لحدوث عملية النقطة الحرجة لثاني أكسيد الكربون، والتى عادة تتم عند ٣١°م وضغط ١٥٠٠ رطل / بوصة مربعة. بعد هذا يفتح صمام التفريغ تدريجيا لكي ينخفض الضغط خلال فترة زمنية تصل إلى عشر دقائق من أجل عدم حدوث تهشم العينة.

عمليات مابعد التجفيف Processing Specimens after Drying

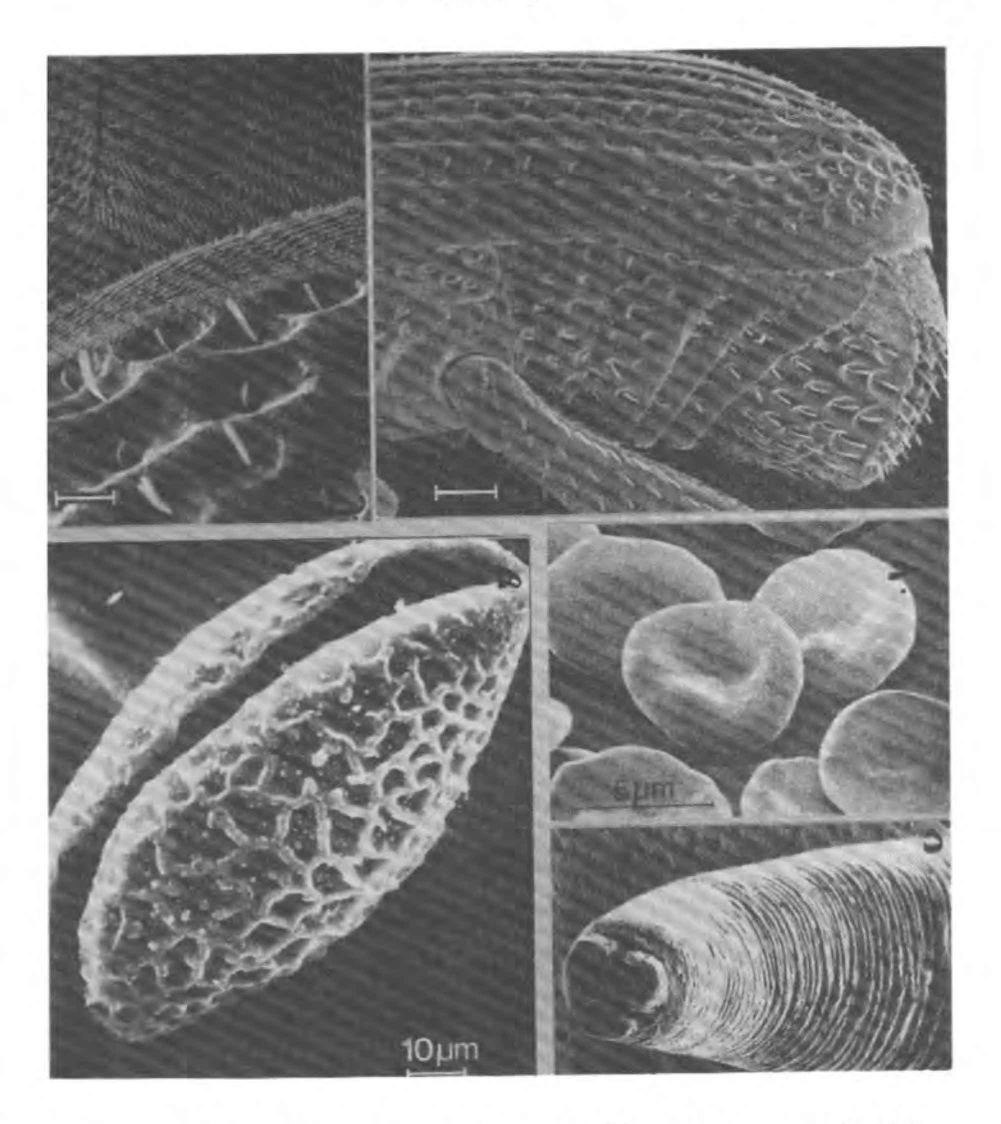
العينات التي تم تجفيفها بالأسيتون أو الكحول أو بطريقة النقطة الحرجة تنقل إلى حامل العينات (Specimen stubs) (شكل ١٢ ـ ٥)، ويمكن لصقها على سطح الحامل بوساطة طلاء الفضة الموصل (Silver-conducting paint) أو بشريط بلاستيكي لاصق ثنائي الوجه (Doubel-side sticky tape). بعد ذلك تنقل العينة إلى جهاز التبخير بالتفريغ (Vacuum evaporator) ، وهذا الجهاز مزود بجهاز إمالة العينة، وقضبان الكربون، وبؤرة تبخير المعادن (شكل ١٢ ـ ٤). توضع العينة في مكانها من الجهاز ثم تغطى بطبقة رقيقة من سبيكة الذهب، أو مزيج من الذهب والبلاديوم تتراوح سمكها بين ١٠ ـ ٣٠ نانومتر، وخلال عمليات التبخير يحاول إمالة حامل العينات لكي يضمن تكون طبقة متناسقة حول العينة، بعدها تفحص باستخدام المجهر الإلكتروني المساح.



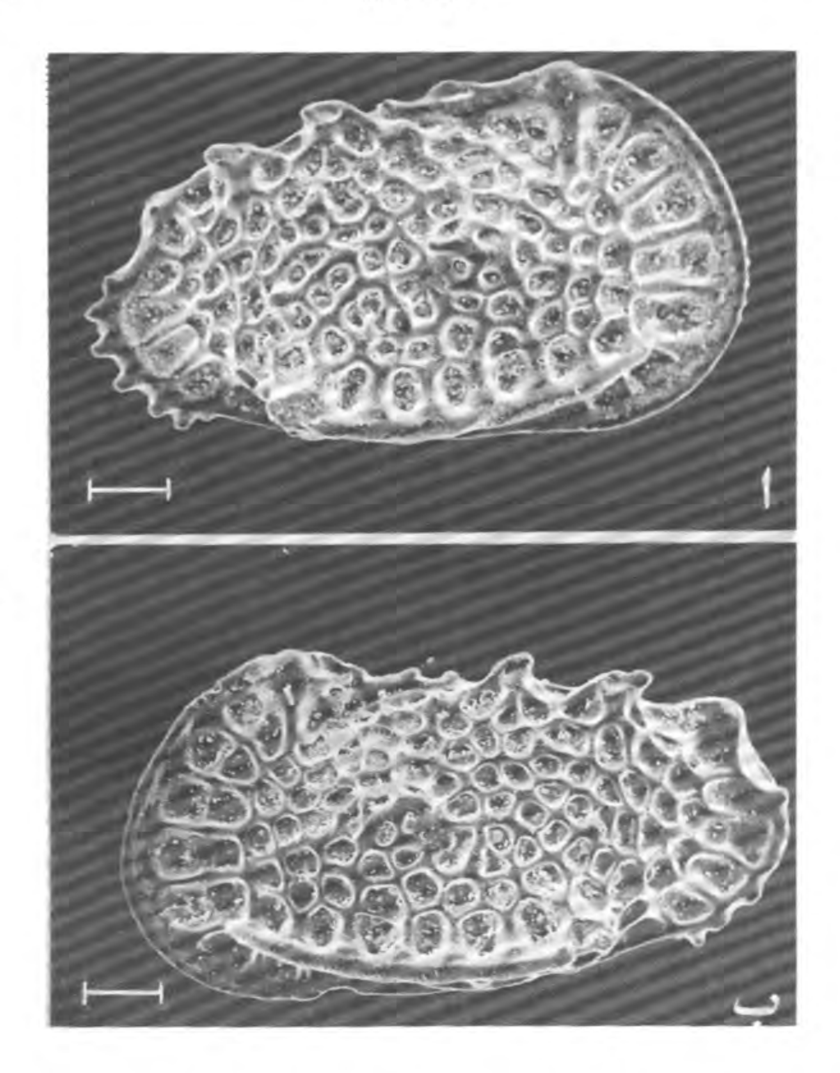
شكل (١٢-٧): أحجام مختلفة من الأوعية المستخدمة لنقل العينات عند إجراء عمليات التجفيف بالنقطة الحرجة. (عن Hayat, 1978)

المميزات العامة

يستخدم هذا النوع من المجاهر الإلكترونية لدراسة طبوغرافية وسطح الخلايا وبعض الكائنات الصغيرة، وعلى الأخص تلك الدراسات التي يحتاج فيها إلى معرفة طبيعة التراكيب السطحية الدقيقة بأبعادها الثلاثة والتي يستحيل الحصول عليها باستخدام المجاهر الإلكترونية النفاذة. لذا يلعب هذا النوع من المجاهر دورا رئيسيا في دراسة العينات الكاملة وبالذات الصغيرة كحبوب اللقاح، وأطوار الفطريات وأسطح الأوراق والحبوب وجلد الحشرات الكيتيني وبيوض الحيوانات والدياتومات، والمنخريات والحفريات الدقيقة وغيرها (شكل ١٢ ـ ٨، ٩). تفيد هذه النتائج في الدراسات التصنيفية وغيرها لما يوضحه المجهر المساح من تراكيب مجسمة سطحية دقيقة تساعد في عمليات الوصف والتفريق بين العينات المختلفة. كذلك تساعد علماء الحفريات على وصف الحفريات الدقيقة بطريقة تمكنهم التمييز بين المجاميع. والجدير



شكل ١٢ ـ ٨: صور بالمجهر الإلكتروني المساح لبعض العينات الإحيائية (البيولوجية).
(ا) منظر جانبي للبطن والصدر في حشرة سوسة الحبوب.
(ب) جزء مكبر من مؤخرة الصورة (ا) يوضح تفاصيل تراكيب جلد هذه الحشرة الكيتيني.
(جـ) صورة لمجموعة من كريات الدم الحمراء (عن Ohnsorge & Holm, 1973).
(د) منظر جانبي للنهاية الأمامية من الأسكارس (عن Ohnsorge & Holm, 1973).
(هـ) صورة لحبيبة لقاح تبين تفاصيل سطح هذه الحبيبة (عن Ohnsorge & Holm, 1973).



شكل ١٢ ـ ٩ : صورة بالمجهر الإلكتروني المساح لنوع استراكودا يدعى *باراجرينو ستيرى باى كلفاتا*
الفريح ١٩٧٥ (Al-Furaih, 1975) . ***Paragrenocythere bielavata*** .
هذا النوع يميز نهاية العصر الطباشيرى وبداية العصر الثالث في المملكة العربية السعودية ـ المقاس = ١٠٠ ميكرومتر (عن الدكتور على الفريح).
(ا) منظر جانبي خارجي لمصراع أيمن و(ب) منظر جانبي خارجي لمصراع أيسر.

بالذكر أن مجاهر المسح الإلكترونية يمكن تشغيلها في مدى واسع من قوى التكبير تتراوح ما بين ١٠× إلى ١٠٠٠٠٠ مرة، أي أنه يعمل في مدى عدسة يدوية إلى قدرة مجهر إلكتروني نفاذ، كما يمكن تغيير قوة التكبير بيسر مما يسهل عملية المسح العام للعينة باستعمال القوة الصغرى ومن ثم التركيز على تكبير الأجزاء أو التراكيب المناسبة بالتفصيل. هذا وتمتلك هذه المجاهر عمق تبئير كبير (Depth of focus) فمثلا عند قوة تكبير ١٠٠٠ مرة، فإن عمق التبئير يصل إلى ١٠ ميكرومتر، لذلك فإن طوبوغرافية الأجسام الصلبة يمكن فحصها بأبعادها الثلاثة. والمجاهر الإلكترونية المساحة سهلة التشغيل نظرا لعدم وجود العدسات الإلكترونية بين العينة والخيال النهائي.

الباب الثالث

المواد والمحاليل

- المخدرات الحيوية
- المثبتات
- الأصباغ
- بيئات اللصق
- المحاليل المنظمة
- المحاليل المتزنة

الفصل الثالث عشر

المخدرات الحيوية

● مقدمة
● أنواع المخدرات

مقـــــدمة

عملية التخـــدير (Narcotization) ضرورية أثنـاء القيام بأية تجارب حيوية من المـحـتـمـــل أن تسبب ألمـــا للحيوان، وبـــالأخص عنـــد القيام بعمليات جراحية (Operative procedures). يصنف التخدير عادة إلى نوعين رئيسيين أحدهما يقصد به تخدير الحيوان لفترة زمنية محددة حيث يحدث بعدها انتعاش للحيوان، ثم يستطيع هذا الكائن القيام بجميع وظائف الحياة. وتعرف المادة المستخدمة لمثل هذا الغرض بالمادة المخـدرة غير القـاتلة (Anaesthesia). ويقصـد بالنوع الآخر من التخدير، تعريض الحيوان إلى مادة مخدرة قوية تؤدى في النهاية إلى موته، وتعرف مثل هذه الحالة بالقتل الرحيم (Euthanasia).

في الوقت الحاضر يوجد العديد من المواد المخدرة، بعضها سائل مثل الكلوروفورم (Chloroform) ، وبعضهـا صلب مثـل نمبيوتال الصوديوم (Sodium nembutal) ، وبعضها غازي مثل غاز الفحم (Coal-gass) ، كما أن التخدير قد يتم بطرق طبيعية كالتغريق أو التبريد للكائن. ويعتبر نمبيوتال الصوديوم من أهم المخدرات غير القاتلة. أمـا مادة اليورثان (Urethane) وغاز الفحم فتعتبران من المواد المخدرة القاتلة. هذه

المخـدرات المختلفـة تتفـاوت كثير فيما بينها من حيث كيفية الاستعمال والتركيز ومدة التأثير. ولهذا سوف نتطرق إلى شرح موجز لأهم المخدرات المستعملة في الدراسات الحيوية.

أنواع المخدرات الحيوية

الكلوروفورم Chloroform

يعتبر الكلوروفورم مخدرا مناسبا لحيوانات المعمل الصغيرة مثل الأرانب والفئران. تتم عملية التخدير بسكب قليل من سائل الكلوروفورم على قطعة صغيرة من القطن، ثم توضع بالقرب من فتحتي أنف الحيوان حتى يتخدر تماما.

نمبيوتال الصوديوم Sodium Nembutal

يعتـبر النمبيوتـال من أحسن المخـدرات غير القاتلة ويناسب معظم الحيوانات الفقـارية (Vertebrate animals) ، حيث يعطى على شكل حقن في عضلات فخذ الحيوان. يمتاز هذا المخدر بأن مفعوله عادة يظهر بعد ٢٠ دقيقة، لكن الحيوان يظل تحت تأثير المخدر لمدة طويلة من الزمن تتراوح بين ساعتين إلى ثلاث ساعات مما يتيح فرصة أطول للدارس في الحصول على الغرض المقصود. يعطى هذا المخدر على شكل محلول ملحي متزن (Balanced salt solution) ضغطه الأسموزي يتناسب مع الضغط الأسموزي لحيوان التجربة، ويكون تركيز النمبيوتال النهائي بنسبة ٢٥ مجم لكل واحد كيلوجرام من وزن جسم الكائن.

الأفرتين Avertin

الأفـرتين يعتبر هو الآخر من المخدرات التي تحقن في جسم الحيوان على شكل محلول ملحي متزن ويعطي بنسبة ٧,٠ جم لكل ١٠٠ جم من وزن الحيوان.

اليورثان Urethane

اليورثان عبارة عن مخدر مميت، ولذا فهو قليل الاستعمال ويعطى على شكل حقن

من محلول تركيزه ٢٥٪ وبمقدار ٦ , ٠ لكل ١٠٠ جم من وزن الحيوان. يمتاز اليورثان بأنه مفيد في حالة العمليات التشريحية التى تحتاج إلى وقت طويل لكن تأثيره التخديري لا يظهر في الحال.

الكحول الإثيلي Ethanol

يعتبر الكحول الإثيلي (Ethyl alcohol) من المخدرات المناسبة للحيوانات اللافقرية التي تعيش في المياه العذبة (Fresh water invertebrates). كما أنه يستعمل كمخدر بنسبة ١٪ ويفضل أن يحضر من الكحول الأثيلي المطلق بدلا من الكحول الصناعي (Industrial spirt).

كلوريد المنجنيز $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

هذا المخدر يناسب الحيوانات البحرية (Marine animals)، حيث يوضع الحيوان في محلول ٥ , ٧٪ كلوريد المنجنيز ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) المذاب في ماء البحر، وعندما تظهر على الحيوان علامات تخدير جزئية بعد بضع دقائق يستحسن أن تعجل عملية التخدير بحقن الحيوان داخليا.

المنثول Menthol

المنثول عبارة عن مادة مخدرة بلورية، ينثر قليل منها على سطح الماء ويترك الحيوان لمدة ليلة كاملة ويعتبر هذا بمثابة مخدر جيد للحيوانات التي تقطن المياه العذبة.

م. س ٢٢٢ MS 222

يعتبر هذا المخدر من أحسن المخدرات المستعملة للأسماك والبرمائيات. وتتم عملية التخدير بغمر الحيوان في محلول مائي يحتوي على جزء واحد من المخدر مخفف حوالي ٢٥ ألف مرة بالماء. تظهر أعراض التخدير على الحيوان المائي في غضون دقيقتين إلى أربع دقائق، لكن تتفاوت الحيوانات المختلفة في سرعة تأثرها بالمخدر.

بخار الإثير Ether Vapour

يعتبر الإثير من المخدرات شائعة الاستعمال في معامل علوم الحياة وبالذات في الدراسات الوراثية Genetical studies فهو بمثابة مخدر ممتاز للحشرات والعناكب والحيوانات الفقارية البرية (Terrestrial vertebrate). تتم عملية التخدير بوضع الحيوان في وعاء جاف وبه قطعة قطن صغيرة مبللة بقليل من سائل الإثير، ثم يغطى الوعاء بغطاء مثقب لغرض حصول الحيوان على كمية كافية من الأكسجين خوفا من عملية الاختناق. الجدير بالاهتمام ضرورة التأكد من عدم السماح لسائل الإثير أن يلامس جلد الحيوان. وعندما يتخدر الحيوان فبالإمكان تغطية ثقوب الغطاء لتعجيل سرعة القتل إذا تطلب الأمر ذلك.

غاز الفحم Coal Gas

غاز الفحم يشبه تماما أبخرة الإثير من حيث الاستعمال، إذ يوضع الحيوان في وعاء جاف له غطاء مثقب، يزود هذا الوعاء بانبوب عن طريقه يمكن التحكم بكمية الغاز. تتم عملية التخدير بالسماح للغاز بالنفاذ إلى الوعاء بشكل بطيء في بادىء الأمر، وتزداد سرعة دخول الغاز بالتدريج حتى يتخدر الحيوان تماما أو تحدث عملية ما يعرف بالتيبس الموتى (Rigor mortis).

الإغراق Drowning

بالإمكان القيام بعملية تخدير طبيعي لبعض الكائنات الحيوانية الأرضية الصغيرة مثل الحشرات التابعة لرتبة نصفية الاجنحة (Hemiptera) ، وذلك بإغراقها في الماء، تتم هذه العملية بوضع الحيوان داخل دورق مملوء بالماء تماما، ومقلوب في وسط طبق هو الآخر مملوء بالماء. يترك الحيوان في الماء حتى يتوقف تماما عن إبداء أي نوع من الحركة.

التبريد Cooling

معــروف أن ظاهــرة البيات الشتــوي (Hipernation) ظاهـرة مميزة للبرمـائيات

(Amphibia) ، والزواحف (Reptile) ، وبعض اللافقريات (Invertebrate) ، حيث تقضي معظم فصل الشتاء في حالة سبات طويل. ولقد استغلت مثل هذه الظاهرة في تخدير الحيوان الزاحف أو البرمائي واللافقري. وذلك بتعريضه لدرجة حرارة منخفضة جدا قد تصل إلى ٢٠°م تحت الصفر. يترك الحيوان عند هذه الدرجة المنخفضة لمدة تتراوح ما بين ١٠ ـ ٣٠ دقيقة حسب نوع الحيوان بعدها تحدث له عملية التيبس الموتي.

الفصل الرابع عشر

المثبتات

● مقـدمـة ● المثبتـات الأوليـة المخثـرة
● المثبتات الأولية غير المخثرة ● المثبتات المركبة

مقدمة

ليس من السهل دراسة الكثير من الأنسجة والخلايا وهي مازالت حية، لكن هناك الكثير من الخلايا التي ليس من السهل عزلها، ولكن بالإمكان دراستها بالتفصيل بعد جعلها بصورة ثابتة أو مستديمة (Permanent) والحصول منها على قطاعات رقيقة. فمن المعروف أن العلاقة بين الأنسجة والخلايا المرتبطة مع بعضها البعض تعطي صورة أكثر وضوحا فيما لو قورنت بالخلايا المعزولة.

لكن الكثير من الحيوانات عديدة الخلايا ليس من السهل تقطيعها إلى شرائح رقيقة وبشكل دقيق وحتى لو قطعت فلن تبقى محافظة على شكلها الحقيقي. لهذا نجد أن الأنسجة والخلايا يجب أن تعامل خصيصا حتى تصبح أكثر ثباتا وبالتالي تصمد للتقطيع. وغالبا لابد من القيام بعملية تثبيت للعينة قبل طمرها في مادة دعامية للحصول على قطاعات رقيقة. لهذا السبب نجد أنه لا مفر من معالجة القطع النسيجية بمحلول يطلق عليه اسم المثبت (Fixative).

إذا فرضنا أن قطعة نسيجية قد عزلت من كائن حي، أو من كائن حديث الوفاة

ولم تحظ بعناية خاصة للحفاظ عليها في صورة جيدة فإنها سرعان ما يطرأ عليها عمليات تغير سريعة. وإذا تركت في الهواء فإنها ربما تفقد الكثير من محتواها المائي وبالتالي تنكمش أو تتغير ملامحها الأصلية. أما إذا تركت في محلول ضغطه الأسموزي عال أو منخفض، فسوف تنكمش أو تنتفخ حسب طبيعة الضغط الاسموزي للمحلول. كذلك، إذا تفادينا المشكلتين السابقتين فيبقى خطر البكتريا (Bacteria) التي تفتك بهذه الأنسجة. وحتى إذا منعنا البكتريا من الوصول إلى هذا النسيج، فإنه سوف يتحلل تلقائيا نظرا لاحتوائه على بعض الإنزيمات المحللة، ويحدث له ما يعرف بالتحلل الذاتي (Autolysis). وكما هو معروف، فالخلايا تحتوي على إنزيمات تعرف باسم الكاثيبسين (Cathepsin) لها القدرة على إذابة بروتين الخلية عند موتها. هذه الإنزيمات المحللة هي إنزيم البروتيناز (Proteinase) وإنزيم الكربوكسيببتداز (Carboxypeptidase) وإنزيم الأمينوببتيداز (Aminopeptidase). لهذه الأسباب لابد من معالجة الأنسجة والخلايا حديثة العزل بمحلول يمنع الانتفاخ أو الانكماش ويقتل البكتريا ويكبح عمل إنزيمات التحليل الذاتي، ومثل هذا المحلول يعرف بالحافظ (Preservative). إذا فالمثبت ما هو إلا محلولا حافظا يمتاز بمقدرته على تقوية الأنسجة حتى تصبح قابلة للطمر والتقطيع، وقد يزيد من سرعة التفاعل النسيجي مع الاصباغ.

ليست جميع المكونات النسيجية تحتاج إلى تثبيت مثل الكيتين (Chitin) والسلليلوز (Cellulose). كما أن المواد السكرية الذوابة لا يمكن إبقاؤها في أماكنها الطبيعية، فيما لو استخدمت المثبتات. لكن إن لم تكن المكونات البروتينية بشكل عام في حالة ثابتة فحتما سوف لا تتحمل الأنسجة والخلايا عمليات التقطيع، ولهذا تعتبر الطريقة الأساسية للمثبت هي تحويل مثل هذه البروتينات إلى الحالات الثابتة.

وبشكل واسع نستطيع أن ندرك أن مثبتات البروتينات إما أن تكون مثبتات مضيفة (Additive fixatives) أو مثبتات غير مضيفة (Non-additive fixatives). إذ في الأولى تتحد بعض ذرات المثبت مع جزء من البروتين الخلوي، وتصبح معه على اتصال تام،

بينما الثانية لا يحدث بها أية إضافة بين المثبت والبروتين.

نجد في المثبتات المضيفة، أن المثبت أو جزءا منه يضاف إلى البروتين عن طريق تكـوين روابط أيونية (Ionic bonds) أو تسـاهمية (مشتركة) (Covalent bonds) وعادة يكـون الاتصـال عن طريق المجمـوعات الجانبية (Side-groups) لواحد أو أكثر من الحموض الأمينية المكونة للبروتين. أما المثبتات غير المضيفة فيعتقد أنها تعمل على نزع جزيئات الماء من البروتين، وبذلك تصبح المجموعات الفعالة (Active-groups) حرة من جزيئات الماء مما يجعلها تكون روابط جديدة مع بعضها البعض تسبب عملية التخثر البروتيني.

ولعل من أهم الشروط التي يجب أن يمتاز بها المثبت هو سرعته في النفاذ إلى داخل الأنسجة الخلوية للعينة، مما يضمن تثبيت البروتينات البروتوبلازمية قبل حدوث عملية التحلل الذاتي. ولقد عرف أن سرعة النفاذية للمثبت تقل مع الزمن، لذا يفضل أن تكون العينات المراد تثبيتها صغيرة جدا (في حدود ١ ـ ٣مم). كذلك يفضل أن تترك العينة لفترة زمنية كافية في المثبت حتى تتم عملية التثبيت. إذ لا توجد فترة زمنية محددة للتثبيت لأنها تعتمد على سرعة نفاذية المثبت، وغالبا ما يعتبر التثبيت لمدة ٢٤ ساعة بمثابة المدة القياسية لمعظم العينات الخاصة بالمجهر الضوئي. أما مدة تثبيت عينات المجهر الإلكتروني فتكون عادة قصيرة تتراوح فيها بين ساعة وساعتين، وقد تكون أقل من الساعة ويرجع هذا إلى عدة أسباب، من أهمها صغر العينات التي لا تزيد عن مليمتر واحد في السمك، وسرعة نفاذية مثبتات المجهر الإلكتروني.

الجدير معرفته أن بعض المثبتات قد تسبب ظهور بعض التغيرات غير الحقيقية أو المصطنعة (Artifacts). ومثل هذه التغيرات إما أن تكون تغيرات مصطنعة خارجية (غير جوهـرية) (Extrinsic)، أو تكـون تغيرات مصطنعة داخلية (جوهرية) (Intrinsic). التغـيرات المصـطنعة الخارجية تعزى عادة إلى المثبت نفسه، أو إلى بعض المخلفات (Deposits) مثـل الحبيبـات السوداء (Black granules) والتي تظهر في العينات المثبتة

بمثبتـات تحتـوى على كلوريد الزئبق. تنتج التغيرات المصطنعة الخارجية من تفاعل المثبت مع المحاليل التي تمر عليها العينة أثناء الإعداد، لكن هذه التغيرات من السهل التخلص منها باستعمال بعض المذيبات الخاصة. أما التغيرات المصطنعة الداخلية أو الجـوهـرية فتعـزى عادة إلى تشـوهـات تركيبية (Distroted structures) في المكونات النسيجية ذاتها، وغالبا ما يحدث مثل هذا عند استعمال بعض المثبتات المخثرة. مثل هذه التغيرات يصعب تفاديها وبالذات عند استعمال المثبتات المخثرة القوية.

كذلـك تتفاوت المثبتات فيما بينها كثيرا من حيث مدى تأثيرها على حجم العينة بالزيادة (انتفاخ Swelling) أو النقص (انكماش Shrinkage). ويعتبر الكحول الاثيلي المـطلق من المثبتـات التي تسبب انكـماشا ملحوظا للعينة، بينما يعتبر حمض الخليك (Acetic acid) من أقـوى المثبتات المسؤولة عن انتفاخ العينة. ولكي نتفادى حدوث مثـل هاتــين الــظاهـرتـين، يمـزج المثبت مع محلول ملحي ضغـطه الأسمـوزي (Osmotic pressure) يعادل الضغط الاسموزي للنسيج الخلوي للعينة.

بهذا نستطيع أن نلخص أهم المميزات أو الشروط الواجب توفرها في المثبت كالآتي:

١ ـ أن يكون سريع النفاذية خلال أجزاء العينة.
٢ ـ أن يحول المواد البروتينية الذائبة إلى مواد غير ذائبة.
٣ ـ أن تكون له القدرة على منع عمليات التحلل البكتيرى والتحلل الخلوي الذاتي.
٤ ـ ألا يسبب للخلايا أي تشوه.

وبشكل عام، يمكن تصنيف المثبتات إلى مجموعتين رئيسيتين على حسب طريقة تفاعلها مع المواد البروتينية الخلوية كالآتي:

١ ـ مثبتات أولية مخثرة Coagulant primary fixatives.
٢ ـ مثبتات أولية غير مخثرة Non-coagulant primary fixatives.

المثبتات الأولية المخثرة

هذه المثبتات لها القدرة على تحويل المواد البروتينية الخلوية الذائبة إلى مواد بروتينية غير ذائبة أو متخثرة (Coagulum) مثل الكحول الاثيلي (Ethanol).

يعتبر الكحول الإثيلي (Ethanol) وكلوريد الزئبق (Mercuric chloride) وثلاثي أكسيد الكروم (Chromium tetroxide) من أشهر المثبتات الأولية المخثرة. يقصد بالمثبت الأولي (Primary fixative) بأنه ذلك المثبت الذي يستطيع أن يقوم بوظيفة التثبيت بمفرده. والمثبتات الأولية المخثرة تتفاوت فيما بينها كثيرا من حيث سرعة النفاذية، وتأثيرها على التراكيب الخلوية، ومدى تفاعلها مع مكونات الخلية البروتينية والدهنية والحموض النووية. يقوم المثبت بتحويل بروتين السيتوبلازم، وغالبا السائل النووى إلى ما يشبه الشبكة الاسفنجية (Sponge-work) ، وهذا التحول الشبكي عادة يكون دقيقا مما يساعد على عملية نفاذ بيئة الطمر وخصوصا مادة البرافين (Paraffin).

الكحول الإثيلي

يستعمل الكحول الاثيلي (Ethanol) أو الكحول الاثيلي المطلق كمثبت أولي، وهو عبارة عن سائل عديم اللون (Colourless fluid) يمتزج بشكل جيد مع الماء ويعتبر من المثبتات الأولية غير المضيفة.

وعلى الرغم من أنه يسبب انكماش نسبي للنسيج الخلوي، إلا أنه يمتاز بسرعة نفاذ معتدلة، ويكسب النسيج صلابة كافية. كما يمتاز هذا المثبت بعدم تكوين أية تغيرات مصطنعة خارجية. وهذا يعني عدم الحاجة إلى غسل العينة لإزالة بقايا المثبت.

وبما أن الكحول الاثيلي لا يهاجم المجموعات الجانبية (Side-groups) للبروتينات لهذا يتركها على حالتها الأصلية مما يسهل عملية الكشف عنها بالأصباغ المناسبة. الجدير بالذكر أن هذا المثبت يعمل على تحطيم الأجسام السبحية (Mitochondria) ، كما يذيب القطرات الدهنية في الخلايا النسيجية.

كلوريد الزئبق

كلوريد الزئبق ($MgCl_2$) عبارة عن بلورات إبرية، عديم اللون، قليل الذوبان في الماء، لكنه يذوب في الكحول الاثيلي والبنزين وهو بمثابة ملح سام. يمتاز هذا المثبت بأن سرعة نفاذيته متوسطة ويسبب انكماشا خلويا طفيفا، إلا أنه يكسب الأنسجة نوعا من الصلابة.

ونظرا لأن هذا المثبت عادة يترك ترسبات حبيبية صغيرة، لذا يجب غسل العينة في محلول ٧٠٪ كحول يحتوي على نسبة قليلة من اليود حيث يعتقد أن اليود يتفاعل مع ترسبات الزئبق مكونا يوديد الزئبق (Mercuric iodide).

ثالث أكسيد الكروم Chromium Trioxide

ثالث أكسيد الكروم (CrO_3) عبارة عن بلورات بنية يذوب بسهولة في الماء، ويستعمل كمحلول مائي مخفف ٥, ٠٪. يمتاز هذا المثبت بسرعة نفاذ بطيئة ويسبب انكماشا ملحوظا، لكنه يكسب الأنسجة نوعا من الصلابة. يجب إزالة آثار المثبت من العينة تماما، وذلك بغسلها بماء الصنبور الجاري لعدة ساعات لأن بقايا المثبت سوف تترك لونا أخضرا نظرا لاختزاله إلى أكسيد الكروم (Cr_2O_3) عندما تمرر العينة على الكحولات.

المثبتات الأولية غير المخثرة

وهي عبارة عن مثبتات لها القدرة على جعل المواد البروتينية أكثر صلابة ولكن بدون فصل جزيئات الماء منها فهي تثبت مادة البروتوبلازم (Protoplasm) بدون تكوين تراكيب اسفنجية داخل الخلايا مثل الفورمالدهيد (Formaldehyde).

المثبتات إما أن تتكون من مادة كيميائية واحدة تعرف باسم المثبتات الأولية (Primary fixatives) أو مثبتات بسيطة (Simple fixatives)، وإما أن يدخل في تكوينها

أكثر من مادة كيميائية، وتعرف في هذه الحالة بالمثبتات المركبة (Compound fixatives) أو المثبتات المخلوطة (Mixture fixatives) مثل مثبت بوان (Bouin's fixative) ، ومثبت روسمان (Rossman's fixative).

المثبتات الأولية غير المخثرة تشكل مجموعة متباينة من المثبتات. الفورمالدهيد (Formaldehyde) ورابع أكسيد الأوزميوم عبارة عن مثبتين مضيفين يكسبان البروتينات نوعا من الصلابة دون نزع جزيئات الماء منها، ومع عدم تكوين أى نوع من التراكيب المجهرية اسفنجية المظهر. أما ثاني كرومات البوتاسيوم (Potassium dichromate) وحمض الخليك (Acetic acid) فيعتبران من المثبات الشاذة، إذ أنهما لا يستطيعان أن يثبتا البروتينات البسيطة (Simple proteins). وتستخدم ثاني كرومات البوتاسيوم لتثبيت بعض أنواع الدهون، أما حمض الخليك فهو يساعد على انتفاخ الخلايا مما يحد من عمليات الانكماش الذي يحدث للأنسجة والخلايا أثناء عملية إعدادها للطمر (Embedding). لكن يعتبر كل من الفورمالدهيد ورابع أكسيد الأوزميوم من أشهر المثبتات في حقل التحضيرات المجهرية، فالأول يستخدم في مجال دراسة كيمياء الأنسجة (Histochemical study) والثاني بمثابة مثبت مناسب لعينات المجهر الالكتروني.

الفورمالدهيد Formaldehyde

الفورمالدهيد (CH_2CO) عبارة عن غاز عديم اللون ويذوب في الماء بنسبة ٤٠٪ ليكون ما يعرف بالفورمالين (Formalin). يمتاز بأنه سريع النفاذية ويكسب النسيج صلابة قوية مع عدم التأثير على حجم الخلايا. يستعمل الفورمالدهيد كمثبت عند تركيز ٤٪، ويحضر مع الفورمالين النقي. وبالإمكان تحضيره في المعمل بإذابة مسحوق البارافورمالدهيد (Paraformldehyde) في الماء عند درجة حرارة ٦٠°م ثم يضاف بضع قطرات من هيدروكسيد الصوديوم المركز حتى يصبح لون المحلول صافيا عندما يصل الأس الهيدروجيني إلى ٧,٢ . يمكن استعمال الفورمالدهيد كمثبت مناسب للعينات عند الرغبة في الكشف عن الدهون، أو المواد السكرية مثل الجليكوجين. كما أنه يثبت

الأجسام السبحية (Mitochondria) ولا يؤثر على شكل النواة، وغالبا لا يحتاج إلى عملية غسيل نظرا لسهولة امتزاجه مع الماء والكحول الاثيلي. يتفاعل الفورمالدهيد مع المجموعات القاعدية في البروتينات، لذا نجد أن الأنسجة والخلايا المثبتة بالفورمالدهيد تصطبغ جيدا مع الأصباغ القاعدية، نظرا لأن المجموعات الحمضية للبروتين حرة. يفضل أن تتراوح مدة التثبيت بين ١٦ ـ ٤٨ ساعة وبالإمكان خزن العينات في المثبت ولفترات طويلة من الزمن.

يسبب هذا المثبت بعض التغيرات الداخلية، حيث ينتج عنه فراغات كبيرة بين الخلايا المتجاورة، كما أن سيتوبلازم الخلايا ينكمش تجاه النواة لذا يستحسن أن يضاف أحد الأملاح المتعادلة مثل كلوريد الصوديوم بنسبة ٧٥, ٠٪ لكي يحد بعض الشيء من التغيرات سابقة الذكر والتى يعتقد أنها ناتجة عن التغير في الضغط الأسموزي.

رابع أكسيد الأوزمويوم Osmium Tetroxide

رابع أكسيد الأوزمويوم (OSO_4) عبارة عن بلورات صفراء تذوب في الماء بنسبة ٧٪ فقط وأبخرته سامة وتتلف الخلايا الطلائية (Epithelial cells) المبطنة للعين والأنف والفم. يعتبر هذا المثبت من المثبتات المضيفة، لكن مكان اتحاده مع البروتين غير معروف ويستعمل كمحلول مائي بتركيز ١٪. يمتاز بسرعة نفاذ بطيئة نسبيا، ولا يؤثر كثيرا على الحجم، ويترك العينة طرية نوعا ما، وتزال آثاره من العينة بالغسل في الماء الجاري. ينفرد هذا المثبت بالقدرة على حفظ التراكيب الخلوية أفضل من أي مثبت آخر، كما يستحسن استخدام مادة الميثاأكريليت (Methacrylate) لطمر العينات المثبتة في رابع أكسيد الأوزميوم. ولقد لوحظ أن الأنسجة والخلايا المثبتة بهذا المثبت تتفاعل مع الأصباغ القاعدية فقط.

ثاني كرومات البوتاسيوم Potassium Dichromate

ثاني كرومات البوتاسيوم ($K_2Cr_2O_7$) عبارة عن بلورات برتقالية اللون، تذوب في الماء بنسبة ١٠٪، وتستعمل كمثبت على شكل محلول مائي تركيزه حوالي ٥, ١٪.

هذا المثبت يترك الأنسجة طرية، ولا يسبب أي تغيير في الشكل العام للخلايا مع العلم أن النوية (Nucleolus) يحدث لها انكماش يعزى إلى فقدان كمية من الحمض النووى الرايبوزى (RNA) ، وتزال آثاره بغسل العينة في الماء الجاري.

الجدير بالذكر أن هذا المثبت لا يستعمل عند الرغبة عند دراسة النواة أو الكروموسومات، لأنه لا يستطيع تثبيت المادة الكروماتينية. كما أن العينات المثبتة بثاني كرومات البوتاسيوم يمكن صبغها بكل من الأصباغ الحمضية والقاعدية.

حمض الخليك Acetic Acid

حمض الخليك ($H_3C{\cdot}COOH$) عبارة عن سائل عديم اللون، ذو رائحة نفاذة، يمتزج جيدا مع الماء والإيثانول ويتبلور بالتبريد. هذا التبلور يذوب عندما تصل درجة حرارة المثبت إلى ١٦,٦°م.

يعرف حمض الخليك المركز باسم حمض الخليك الثلجي (Glacial acetic acid) وهو سريع النفاذية، ويثبت الحموض النووية، كما يسبب زيادة ملحوظة في حجم الخلايا. لذا يضاف إلى كثير من المثبتات المركبة، لكي يحد من عملية الانكماش التي تنتج أثناء عملية الطمر.

هذا المثبت لا يؤثر على صلابة النسيج، ولا يحدث أية تغيرات خارجية، ولا يحتاج إلى عملية غسل لسهولة امتزاجه مع الكحول الاثيلي.

يعتبر حمض الخليك من المثبتات المشهورة في الدراسات السيتولوجية وبالذات لدراسة كروموسومات الخلية. ويصنف هذا المثبت ضمن المثبتات غير المضيفة.

المثبتات المركبة Compound Fixatives

يعتبر الفورمالدهيد ورابع أكسيد الأوزمويوم الوحيدين من المثبتات الأولية التي

يمكن استعمالهما عمليا على شكل منفصل، أما بقية المثبتات الأولية فهي غالبا تمزج مع بعضها البعض بنسب تتفاوت حسب طبيعة الدراسة.

عندما يدخل في تركيب المثبت أكثر من مادة مثبتة أولية يعرَّف بالمثبت المركب أو المخلوط (Mixture fixative)، ومعظم المثبتات عبارة عن مثبتات مركبة.

المثبتات المركبة عديدة لكن يجب التركيز على أكثرها استعمالا في مجال التحضيرات المجهرية الضوئية ومنها:

مثبت كلارك ١٨٥١ Clarke's Fixative

يتكون من مثبتين أوليين هما:

١ ـ الكحول الأثيلي المطلق C_2H_5OH ٣ أجزاء

٢ ـ حمض الخليك الثلجي $H_3C{\cdot}COOH$ ١ جزء

هذا المثبت يعتبر من أقدم المثبتات المركبة المستعملة في التحضيرات المجهرية.

حمض الخليك الثلجي عبارة عن مثبت أولي يتسبب في انتفاخ الخلايا بينما الكحول الأثيلي المطلق هو الآخر بمثابة مثبت أولي، لكنه يؤدى إلى انكماش الخلايا. لذا يمزج المثبتين معا لتفادى الانكماش الناتج عن الكحول الأثيلي والانتفاخ الناتج عن حمض الخليك الثلجي. ومن المعروف أن الكحول المطلق مسؤول عن تثبيت السائل النووى والسيتوبلازم إلا أنه لا يستطيع تثبيت البروتينات النووية (Nucleo-proteins) وهذا يقوم به حمض الخليك الثلجي.

يستعمل هذا المثبت بكثرة في الدراسات التشريحية والنسيجية (Anatomical and histological studies) وأيضا في الدراسات السيتولوجية (Cytological studies) وبالذات في دراسة الكروموسومات (Chromosomes) لكنه غير مناسب عند دراسة التراكيب السيتوبلازمية مثل الأجسام السبحية لأنه يذيب الكثير من الدهون، كما ويسبب عملية تخثرا خشنا يؤدى إلى تحطيم مثل هذه التراكيب.

مثبت زنكر ١٨٩٤ Zenker's Fixative

مثبت زنكر عبارة عن مثبت عام بل يعتبر من أحسن مثبتات الأنسجة نظرا لأنه يحافظ على المعالم الخلوية (Cytological details) بشكل ممتاز، ويتكون من :

١ ـ كلوريد الزئبق	$HgCl_2$	٥ جم
٢ ـ ثاني كرومات البوتاسيوم	$K_2Cr_2O_7$	٢,٥ جم
٣ ـ كبريتات الصوديوم	$Na_2SO_4.H_2O$	١ جم
٤ ـ ماء مقطر	H_2O	١٠٠مل
٥ ـ حمض الخليك الثلجي	$H_3C \cdot COOH$	١ مل

تحضر المكونات الأربع الأولى كل على حدة، وعند الاستعمال يضاف حمض الخليك الثلجي وتترك العينة لمدة ٣ ـ ١٨ ساعة بعدها تغسل بالماء الجاري لمدة ليلة كاملة قبل نقلها إلى ٧٠٪ كحول اثيلي يحتوي على قليل (٠,٥٪) من اليود يدخل في تركيب هذا المثبت نوعان من المثبتات المخثرة وهما الأول والثاني ومثبت مضاد للانكماش هو حمض الخليك الثلجي .

مثبت فلمنج ١٨٨٤ Flemming's Fixative

يحضر هذا المثبت المركب من خليط لثلاث مثبتات أولية هي :

١ ـ ٢٪ رابع أكسيد الاوزمويوم	OSO_4	٠,٨ مل
٢ ـ ٥٪ ثالث أكسيد الكروم	CrO_3	٠,٤ مل
٣ ـ ٢٠٪ حمض الخليك	$H_3O \cdot COOH$	٠,٥ مل
٤ ـ ماء مقطر	H_2O	٠,٨ مل

يعتقد أن إضافة المثبت المُخثِر، ثالث أكسيد الكروم يساعد في الحصول على قطاعات برافينية جيدة لأن الشبكة الاسفنجية التي تتكون، عندما تستعمل مثل هذه المثبتات، تساعد على تكوين فراغات تتخللها بسهولة مادة البرافين. وإضافة المثبت غير المخثر، رابع أكسيد الاوزمويوم يغطي النقص الناتج عن المثبت المخثر، أما حمض

الخليك فمعروف دوره في المساعدة على منع الانكماش النسيجي والذي يحدث عادة أثناء إعداد العينة للقطع. تترك العينة في المثبت لمدة ٢٤ ساعة، بعدها تغسل في الماء الجاري لمدة ٢ ـ ٤ ساعات قبل نقلها إلى ٣٠٪ كحول إثيلي.

مثبت هيلي ١٩٠٣ Helly's Fixative

هذا المثبت عبارة عن خليط لثلاث مثبتات أولية حسب النسب التالية:

١ ـ كلوريد الزئبق	$Hgcl_2$	٥ جم
٢ ـ ثاني كرومات البوتاسيوم	$K_2Cr_2O_7$	٢,٥ جم
٣ ـ كبريتات الصوديوم	$Na_2SO_4 \cdot H_2O$	١ جم
٤ ـ ماء مقطر	H_2O	١٠٠ مل
٥ ـ فورمالين	H_2CO	٥ مل

تمزج المكونات الأربعة الأولى معا، وعند الاستعمال يضاف الفورمالين. يفضل قبل عملية غسل آثار المثبت في ٧٠٪ كحول إثيلي إضافة ٠,٥٪ يود إلى محلول الغسيل. وعملية الغسل هذه ضرورية نظرا لأن كلوريد الزئبق يسبب تغيرات مصطنعة خارجية على شكل ترسبات حبيبية سوداء تذوب بغسلها في الكحول المحتوي على اليود. يمكن أيضا نقل العينة مباشرة من المثبت إلى محلول مائي من ثاني كرومات البوتاسيوم المشبع عند درجة حرارة ٣٧°م يترك لمدة ٢٤ ـ ٤٨ ساعة ينقل بعدها إلى كحول ٧٠٪ به قليل من اليود، ثم تكمل عملية نزع الماء في سلسلة كحولية ذات تركيز متدرج في الارتفاع. يعتبر مثبت هيلي بمثابة مثبت مناسب لدراسة التراكيب السيتوبلازمية (Cytoplasmic inclusions) بما فيها الدهون والأجسام السبحية.

مثبت التمان ١٨٩٤ Altmann's Fixative

هذا مثبت يتكون من مثبتين أوليين بالنسب الآتية:

١ ـ ٢٪ رابع أكسيد الاوزميوم المائي	OsO_4	١ جزء
٢ ـ ٥٪ ثاني كرومات البوتاسيوم المائية	$K_2Cr_2O_7$	١ جزء

يعتبر بمثابة مثبت مناسب لدراسة الأجسام السبحية (الميتاكوندريا)، ويفضل أن يكون سمك العينة في حدود ٢ مم، وأن تترك في المثبت لمدة ٢٤ ساعة، بعدها تغسل بالماء الجاري لمدة ليلة كاملة. وبما أن ثاني كرومات البوتاسيوم مادة مؤكسدة أقوى من رابع أكسيد الاوزميوم لذا فهي تمنع تكون اللون الأسود الذي ينتج أحيانا عند استعمال رابع أكسيد الأوزميوم. لا يستعمل هذا المثبت لدراسة النواة والكروموسومات نظرا لأنه يذيب البروتينات النووية.

مثبت كارنوي ١٨٨٦ Carnoy's Fixative

يتكون هذا المثبت من ثلاثة مثبتات أولية ممزوجة معا بالنسب الآتية:

١ ـ كحول أثيلي مطلق C_2H_5OH ٦٠ مل

٢ ـ كلوروفورم $CHCl_3$ ٣٠ مل

٣ ـ حمض خليك ثلجي $H_3C{\cdot}COOH$ ١٠ مل

هذا المثبت المركب يشبه تماما مثبت كلارك، إذ يستخدم في دراسات النواة والكروموزومات لكنه يتلف معظم التراكيب السيتوبلازمية. تثبت العينة لمدة ٢ إلى ٢٤ ساعة ولا يحتاج إلى عملية الغسل.

مثبت بوان ١٨٩٧ Bouin's Fixative

يعتبر مثبت بوان من المثبتات المركبة التي تناسب أنسجة اللافقريات البحرية والثدييات. يستثنى من ذلك أنسجة الكلية والأعضاء التي تحتوي على خلايا مخاطية (Mucous cells) ويتكون من الآتي:

١ ـ حمض البكريك (محلول مائي مشبع) ٧٥ مل

٢ ـ فورمالدهيد (٤٠٪) ٢٥ مل

٣ ـ حمض خليك ثلجي ٥ مل

تثبت العينة لمدة ١٢ ساعة وبالإمكان حفظها في هذا المثبت لفترة أطول، لكن يجب غسل أثار المثبت الزائدة وبالذات حمض البكريك (والذي يعطي العينة لونا

أصفر) في عدة تغيرات من ٧٠٪ كحول اثيلي، ويفضل ألا تمزج المكونات السابقة إلا عند الاستعمال فقط.

مثبت بوان الكحولي Alcoholic Bouin's Fixative

يسمى أيضا بمثبت دوبيك - برازيل Duboscq-Brasil's fixative ويمتاز هذا المثبت بأنه ذو سرعة نفاذية عالية، ولذا يستخدم في تثبيت الحيوانات المفصلية والتي تعطي أجسامها مواد صلبة، أو ما يعرف بالجليد (Cuticle) ويتكون من الآتي:

١ - كحول إثيلي ٨٠٪	١٥٠ مل
٢ - فورمالين	٦٠ مل
٣ - حمض خليك ثلجي	١٥ مل
٤ - حمض بكريك	١ جم

تثبت العينة لمدة ساعتين أو أكثر (علما بأنها تتصلب وتصبح هشة كلما طالت مدة التثبيت) ثم تغسل في عدة تغيرات من الكحول ٩٠٪.

مثبت هيدنهين (سوسا) ١٨٩٢ Heidenhain's (Susa) Fixative

يستعمل هذا المثبت عند دراسة الأنسجة وبالذات أنسجة اللافقريات، ويتكون من الآتي:

١ - كلوريد الزئبق	$HgCl_2$	٤٥ جم
٢ - كلوريد الصوديوم	NaCl	٥ جم
٣ - ماء مقطر	H_2O	٨٠٠ مل
٤ - حمض ثالث كلور الخليك	$Cl_3C{\cdot}COOH$	٢٠ جم
٥ - فورمالدهيد (٤٠٪)	HCHO	٢٠٠ مل
٦ - حمض الخليك الثلجي	$H_3C\text{-}COOH$	٤٠ مل

تمزج المكونات الثلاثة الأولى معا، وعند الاستخدام تضاف بقية المكونات الأخرى، ويفضل استعمال ماء البحر (Sea water) بدلا من الماء المقطر، إذا كانت

العينة معزولة من حيوان بحري. مدة التثبيت تتراوح بين ٢ - ٢٤ ساعة بعدها تنقل إلى ٩٦٪ كحول إثيلي يحتوي على قليل من اليود (٠,٥٪). من المعروف أن كلوريد الزئبق في هذا المثبت لا يسبب أية تغيرات مصطنعة خارجية كما هي الحال في بقية المثبتات الداخل في تركيبها.

مثبت شامبي ١٩١١ Champy's Fixative

أحد المثبتات التي تحتوى على رابع أكسيد الاوزميوم الذي يعتبر مناسب جدا لدراسة التراكيب السيتوبلازمية للخلايا بشكل عام وبالذات الحيوانات الأولية (Protozoa)ويتكون من الآتي:

١ - ١٪ حمض الكروم المائي		٧ مل
٢ - ٣٪ ثاني كرومات البوتاسيوم المائية	$K_2Cr_2O_7$	٧ مل
٣ - ٢٪ رابع أكسيد الاوزميوم المائي	OsO_4	٢ مل

تثبت العينة لمدة ٢٤ ساعة، بعدها تغسل بالماء الجاري لمدة خمس ساعات، ثم تنقل إلى ٣٠٪ كحول اثيلي بعدها ينزع منها الماء بالتدريج البطىء.

مثبت شاودن Schaudin's Fixative

يتركب هذا المثبت من ثلاثة مثبتات أولية تمزج معا بالنسب الآتية:

١ - كلوريد الزئبق المشبع (المائي)	$HgCl_2$	١٠٠ مل
٢ - كحول إثيلي مطلق	C_2H_5OH	٥٠ مل
٣ - حمض الخليك الثلجي	$H_3C{\cdot}COOH$	٥ مل

يضاف حمض الخليك الثلجي قبل عملية التثبيت مباشرة وتترك العينة في هذا المثبت لمدة ١٥ إلى ٦٠ دقيقة بعدها تغسل في محلول ٧٠٪ كحول يحتوي على ٠,٥ من اليود.

يستعمل مثبت شاودن خصيصا لتثبيت الأوليات وبالأخص عند إجراء كشف فولجن (Feulgen).

مثبت سانفيليس ١٩١٨ Sanfelice's Fixative

يعتبر هذا المثبت من المثبتات غير الثابتة، نظرا لأنه يحتوي على مادة مختزلة وهي الفورمالدهيد ومادة مؤكسدة وهي حمض الكروم، لذا يحضر على شكل مجموعتين كالآتي:

المجموعة الأولى وتتكون من:

١ - ٢٪ حمض الكروم المائي.	١٠٠ مل
٢ - ٢٪ حمض الخليك المائي.	٦٠ مل

المجموعة الثانية وتتكون من:

١ - فورمالدهيد	١٠٠ مل
٢ - ماء مقطر	٦٠ مل

يمزج، قبل الاستعمال مباشرة، حجم معلوم من المجموعة الأولى مع نفس الحجم من المجموعة الثانية، وتثبت العينة لمدة ساعة واحدة، بعدها تغسل العينة تحت الماء الجاري لمدة ساعة أخرى قبل نقلها إلى سلسلة تركيزها متدرج الارتفاع من الكحول الاثيلي، تبدأ من ٣٠٪ يمكن خزن العينة بعد ذلك في ٧٠٪ كحول إثيلي عند درجة حرارة ٤°م. يعتبر هذا المثبت من أحسن المثبتات النووية (Nuclear fixatives) الذي يستخدم بكثرة في دراسة الكروموسومات والانقسامات الخلوية النباتية.

مثبت هولاندى Hollande's Fixative

يتركب هذا المثبت من المكونات الآتية:

١ - خلات النحاس	٢٥ جم
٢ - حمض البكريك	٤ جم
٣ - فورمالدهيد	١٠ مل
٤ - حمض الخليك الثلجي	١,٥ مل
٥ - ماء مقطر	١٠٠ مل

تذاب اسيتـات النحـاس في الماء المقطر البارد ثم يضاف إليها حمض البكريك ببطء، وقبل الاستعمال مباشرة يضاف الفورمالدهيد وحمض الخليك الثلجي. يجب أن تغسـل العينة بالماء قبل إعدادها للصبغ. يستعمل هذا المثبت مع الأوليات والخلايا المعزولة التي لا تحتاج إلى عملية طمر وتقطيع وهو بمثابة مثبت جيد لدراسة التراكيب السيتوبلازمية مثل أجسام جولجي (Golgi bodies).

مثبت سيرا Serra's Fixative

يتكـون هذا المثبت من ثلاثـة مثبتات أولية، مثبت مخثر وهو الكحول الاثيلي، ومثبتين غير مخثرين، هما الفورمالدهيد وحمض الخليك الثلجي، وتمزج معا بالنسب الآتية:

١ ـ كحول إثيلي مطلق	٦ أجزاء
٢ ـ فورمالدهيد	٣ أجزاء
٣ ـ حمض الخليك الثلجي	١ جزء

يستخدم هذا المثبت عند دراسة الحموض النووية مثل حمض (DNA) وحمض (RNA).

مثبت تيجو ١٩٥٨ Tjio's Fixative

يشبه مثبت سيرا كثيرا ما عدا أن الكحول الاثيلي المضاف بتركيز ٩٥٪ بدلا من ١٠٠٪، وكمية حمض الخليك الثلجي المضافة تكون أيضا أقل ويتكون من الآتي:

١ ـ ٩٥٪ كحول إثيلي	٦ أجزاء
٢ ـ حمض الخليك الثلجي	٢ جزء
٣ ـ فورمالدهيد	١ جزء

يستعمل هذا المثبت مع الخلايا المعزولة أو الخلايا المزروعة على أغطية الشرائح (Cells on cover-slips) عند الرغبة في دراسة الكروموسومات الخلوية حيث يساعد على فرد مثل تلك التراكيب. تثبت العينة لمدة من ٣٠ دقيقة إلى ٢٤ ساعة، لكن التثبيت

الطويل غير مرغوب فيه، كما هو متبع في معظم المثبتات التي يدخل في تركيبها حمض الخليك الثلجي .

مثبت ديفدسن Davidson's Fixative

يشبه مثبت تيجو لكنه يحتوي على نسبة عالية من الماء والفورمالدهيد ويتكون كالآتي :

١ ـ ماء مقطر	٣٥ مل
٢ ـ ٩٥٪ كحول إثيلي	٣٠ مل
٣ ـ فورمالدهيد	٢٠ مل
٤ ـ حمض الخليك الثلجي	١٠ مل

تثبت العينة لمدة ٢٤ ساعة بعدها تنقل إلى ٧٠٪ كحول اثيلي وتترك لمدة ١٢ ـ ٧٢ ساعة قبل عملية إعدادها للطمر والتقطيع . يستعمل هذا المثبت عند الرغبة في دراسة كروماتين الجنس (Sex chromatin) والذي لا يمكن تمييزه إلا في الطور البيني (Interphase) للخلايا .

وأخيرا يمكن تصنيف المثبتات المركبة إلى أربع مجموعات رئيسية على حسب نوع المثبتات الأولية التي تدخل في تركيبها وهي :

المجموعة الأولى: تتكون من مثبتات مخثرة + حمض خليك
(Coagulant + acetic acid)
وتستعمل في الدراسات التشريحية والنسيجية مثل مثبت كلارك وزنكر.

المجموعة الثانية: تتكون من مثبتات مخثرة + مثبتات غير مخثرة + حمض خليك .
(Coagulant + non-congulant + acetic acid)
وتستعمل في الدراسات النسيجية والسيتولوجية (Histological and cytological studies) والكثير منها يستعمل في دراسة الكروموسومات مثل مثبت فلمنج وبوان وسوسا وهرمان وسانفليز.

المجموعة الثالثة: تتكون من مثبتات مخثرة ومثبتات غير مخثرة.

(Coagulant + non-coagulant)

وتعتبر من أحسن المثبتات المناسبة للحفاظ على التراكيب السيتوبلازمية (Cytoplasmic inclusions) مثل مثبت هيلي وسامبي ولويسكي ومان ومثبت زنكر بدون حمض الخليك.

المجموعة الرابعة: تتكون من مثبتات مخثرة فقط (Coagulant). هذه مجموعة قليلة من المثبتات المطورة لتناسب دراسة التراكيب السيتوبلازمية مثل مثبت التهان وريجيود (Regaud).

الفصل الخامس عشر

الأصبــاغ

● مقدمة ● تصنيف الأصباغ ● العوامل المؤثرة على الصبغ

مقـــــدمة

تعرف الأصباغ المستخدمة في التحضيرات المجهرية بأنها تلك المواد التي تستعمل لتلوين التراكيب الخلوية (Cellular structures) المختلفة لكي يصبح من السهل رؤيتها وتمييزهـا عن بعضهـا البعض. والأصبـاغ معـروفـة منذ القدم، فلقد كان الإنسان يستخـدمها في صبغ الملابس والجلود. وتعتبر صبغة الاليزارين (Alizarin) من أقدم الصبغـات، وتستخلص من بعض جذور الأشجـار. صبغـة الحنا هي الأخرى من الأصباغ الطبيعية التي تستخدمها النساء للزينة وهي عبارة عن مسحوق أوراق نبات الحناء.

من المعـروف أن الضـوء العادي يتكون من سبعة ألوان مختلفة (ألوان الطيف) يمكن تميزها بوساطة المنشور الزجاجي، لذا نستطيع القول بأن المادة السوداء لها القدرة على امتصاص جميع ألوان الطيف ولذا تبدو مادة مظلمة، أما المادة الحمراء فلها القدرة على امتصاص جميع الألوان ما عدا اللون الأحمر. إذن لون المادة يعتمد على طبيعة لون الـطيف المنعكس عنهـا. تتبـاين المـواد المختلفة كثيرا فيما بينها من حيث قدرتها على امتصـاص وعكس ألوان الطيف الضوئي وهذا مرتبط بتركيب جزيئات المادة ونوعية الـروابط بين ذراتهـا، ولقد لوحظ أن معظم المواد الملونة تكثر فيها الروابط المزدوجة

«الثنائية» مثل مادة الكلوروفيل (Chlorophyle) الخضراء في النبات أو مادة الليكوبين (Lycopene) الحمراء في الطماطم. والأصباغ عبارة عن مركبات عضوية قد تكون عطرية (Aromatic) أو تشبه الملح (Salt-like) ومتبلورة صلبة (Crystalline solid) لكنها تذوب في الماء أو المحاليل المائية على شكل أيونات (Ions)، قد تكون أيونات موجبة (Cations) أو أيونات سالبة (Anions) ملونة. تتحد الأيونات الملونة كيميائيا مع جزيئات المكونات الخلوية للعينة بشكل عام وعندما يحدث مثل هذا الاتحاد فإن الأيونات لا تفقد لونها وينعكس ذلك اللون على العينة نفسها. الصبغة مادة عضوية تتكون من شقين، شق يعزى إليه لون الصبغة ويعرف بالحامل اللوني (Cromatophore) وشق يعزى إليه ارتباط حامل اللون مع جزيئات المادة المراد صبغها، ويطلق عليه اسم مساعد التلوين (Auxochrome).

تصنيف الأصباغ

وعموما تصنف الاصباغ تبعا لنوعية مساعد التلوين إلى الآتي:

(١) أصباغ قاعدية Basic dyes

(٢) أصباغ حمضية Acidic dyes

(٣) أصباغ متذبذبة Amphoteric dyes

الأصباغ القاعدية

إذا كان مساعد التلوين لديه القدرة على الارتباط مع الأيونات (Anions) لجزيئات المادة المراد صبغها فالصبغة قاعدية. كما تعرف الأصباغ القاعدية بتلك الأصباغ التي لها القدرة على صبغ الأجزاء الحمضية من التراكيب الخلوية مثل صبغة فولجن (Feulgen) والمعروف أنها تتفاعل مع محتويات النواة الحمضية مثل مادة الد. ن. أ. وتعرف المادة التي تصطبغ بالصبغات القاعدية بالمادة محبة للصفات القاعدية (Basophilic). عادة الأصباغ القاعدية يكون مساعد التلوين فيها عبارة عن مجموعة أمينية ($-NH_2$) أو أحد مشتقاتها.

الأصباغ الحمضية

أما إذا كان مساعد التلوين لديه القدرة على الارتباط مع الكاتيونات (Cations) فالصبغة حمضية أو تلك الصبغة التي لها القدرة على صبغ الأجزاء الخلوية القاعدية مثل صبغة الأيوسين (Eosin). أما المادة التي تصطبغ بالصبغات الحمضية فتعرف بالمادة محبة الصفات الحمضية (Acidophilic). مساعد التلوين في الأصباغ الحمضية عبارة عن مجموعة هيدروكسيلية (OH-) أو كربوكسيلية(COOH-) أو كبريتية (SO_3H-). ويعتبر حمض البكريك (Picric acid) من الأصباغ الحمضية ويعزى لونه الأصفر إلى مجموعة النترو (NO_2-) ، أما عملية التفاعل أو الارتباط فتعزى إلى وجود مجموعة الهيدروكسيل (OH-).

الأصباغ المتذبذبة

يوجد نوع خاص من الأصباغ تكون بمثابة صبغة قاعدية في الوسط الحمضي وحمضية في الوسط القاعدي، مثل هذه الأصباغ تعرف بالأصباغ المتذبذبة (Amphoteric) مثل صبغة الهياتين (Haematin).

كما يمكن تقسيم الأصباغ إلى قسمين رئيسيين بناء على طبيعة المادة الصبغية إذا كانت طبيعية المصدر أو مصنعة.

الأصباغ الطبيعية

الأصباغ الطبيعية (Natural dyes) تتمثل في تلك الأصباغ المستمدة من مصادر طبيعية سواء كانت حيوانية أو نباتية. من الأصباغ ذات المصدر الحيواني، صبغة القرمز (Cochineal) والمستخرجة من لعاب أنثى حشرة الكوكس (Coccus). أما الأصباغ ذات المصدر النباتي فهي كثيرة وتعتبر صبغة الهياتوكسلين (Haematoxylin) بمثابة المثال النموذجي والمستخرجة من نبات الكاسالبينا(Caesalpina) الموجود بشكل شائع في أمريكا الجنوبية.

الأصباغ المصنعة

الأصباغ المصنعة أو المركبة (Synthetic or compound dyes) تمثل الغالبية العظمى من الأصباغ المستعملة في عصرنا الحاضر، ويقصد بها تلك الأصباغ المحضرة نتيجة لعدة تفاعلات كيميائية. تكمن أهمية هذه الأصباغ أساسا في إمكانية صبغ العينة بأكثر من لون واحد، وذلك بمزج العديد من الأصباغ معا أو بتمرير العينة على محاليل طيفية مختلفة.

كما تصنف الأصباغ أيضا على حسب طبيعة الصبغ إلى:

ا ـ صبغ بسيط (Simple staining) : عندما تتلون مكونات النسيج الخلوي بلون واحد.

ب ـ صبغ متخصص (Specific staining) : وهذا النوع من الصبغ يتم بحيث تصطبغ مكونات خلوية محددة بلون خاص مثل استخدام صبغة فولجن لصبغ مادة الحمض النووى الريبوزي اللاأوكسجيني (DNA) في النواة.

جـ ـ صبغ مضاد (Counter staining) : ويقصد بهذا النوع من الصبغ بأن تصبغ أجزاء محددة من العينة بلون خاص وتصبغ بقية الأجزاء بلون آخر معاكس مثل استخدام صبغة الأيوسين وصبغة الهيماتوكسلين.

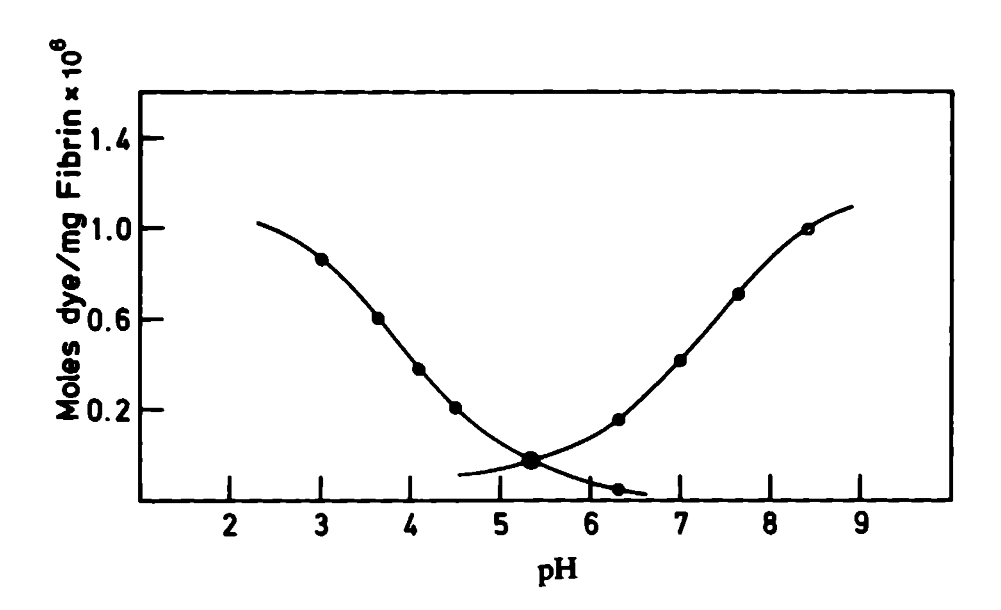
د ـ صبغ متعدد (Multiple staining) : ويقصد به صبغ مكونات العينة النسيجية بألوان مختلفة في آن واحد سواء كان باستخدام صبغة واحدة مثل صبغة لشمان (Leishmann) ، أو مزيج من العديد من الصبغات في محلول واحد مثل صبغة مالورى (Mallory) أو أن تمرر العينة أثناء الصبغ على العديد من محاليل الصبغ المختلفة.

العوامل المؤثرة على الصبغ

توجد عوامل كثيرة تؤثر على عملية الصبغ مثل تركيز أيونات الهيدروجين أو ما يعرف بالأس الهيدروجيني (pH) ، المثبت، درجة الحرارة، قوة تأين الصبغة نفسها، الترابط الكيميائي (Chemical affinity) ، التركيز (Concentration) ، نفاذية الصبغة (Permeability) داخل أجزاء العينة.

الأس الهيدروجيني

لقد وجد أن الأس الهيدروجيني يلعب دورا مهما في عملية الصبغ سواء مع الأصباغ الحمضية أو القاعدية على حد سواء. عند دراسة تأثير الأس الهيدروجيني على صبغ بروتين الفبرين (Fibrin) بكل من صبغة الأخضر السريع (Fast green) الحمضية وصبغة أزرق المثيلين (Methelene blue) القاعدية اتضح من الدراسة أن كلتاهما تتفاعل بدرجة قوية مع الفبرين عند أس هيدروجيني محدد. يصطبغ البروتين جيدا عندما يصل فيه الأس الهيدروجيني إلى ٣ (pH 3) في حالة الصبغ بالأخضر السريع، وعندما تصل قيمة الأس الهيدروجيني ٨ (pH 8) في حالة الصبغ بأزرق المثيلين (شكل ١٥ ـ ١).



شكل ١٥ ـ ١: العلاقة بين الأس الهيدروجيني ونوعية الصبغة.
○—○ صبغة أزرق المثيلين.
●—● صبغة الأخضر السريع.

المثبـــت

لقـد وجـد أن الـتراكيب الخلوية تتفـاعل بشكل أوضح مع الأصباغ الحمضية والقاعدية بعد التثبيت، كما أن نوع المثبت يلعب دورا مهما في عملية التفاعل الكيميائي للأصباغ. يعزى تأثير المثبت المستخدم على صبغة ما دون أخرى إلى الترابط الذي يتم بين المثبت ومجمـوعـات خاصـة في بروتينـات العينـة المصبـوغة، مما يجعل مثل هذه المجموعات غير قابلة للتفاعل مع الأصباغ الأخرى من الصبغات.

العينات المثبتة في الفورمالدهيد لديها قدرة جيدة للتفاعل مع الأصباغ القاعدية، بينما تلك العينات المثبتة في كلوريد الزئبق تصطبغ بدرجة قوية مع الأصباغ الحمضية. يعتقد أن زيادة قابلية الأصطباغ بالصبغات الحمضية في الأنسجة المثبتة بوساطة كلوريد الـزئبق أو ثاني كرومـات البـوتـاسيوم ناتـج عن اتحـاد أيونات الزئبق أو الكروم مع المجموعات الحمضية الحرة للبروتين وبالذات مجموعات الكربوكسيل والهيدروكسيل وكذلك حمض الفوسفور (Phosphoric acid) في الحموض النووية (Nucleic acids). أما المثبتـات الحمضية مثـل مثبت كارونـوى (Carnoy's fixative) والـذي يعتـبر بمثـابة مثبت خاص للكـرومـوسـومـات نظرا لقدرته الفائقة على ترسيب البروتينات النووية (Nucleoproteins) وتـكســير الــروابط بين الحمــوض النــووية والــبروتينــات في الكروموسومات، لذا يعتقد أن مثل هذا التفاعل آنف الذكر يسبب تحرير عدد كبير من المجموعات الحمضية للبروتينات والحموض النووية مما يؤدى إلى التفاعل القوى مع الأصباغ القاعدية.

الترابط الكيميائي

يعتمـد الـترابط الكيميائي بين مكونات الأنسجة الخلوية والأصباغ أساسا على نوعية هذه المكـونـات. وهنـاك الكثـير من المكـونـات النسيجية التي تعتـبر بمثـابـة مكـونـات خلوية حمضية مثـل الحمض النـووي الرايبوزي اللاأوكسجيني (DNA) والكـرومـاتـين والحمض النـووي الـرايبـوزي (RNA) والـبروتينات النووية الريبوزية (Ribonucleo protein) والمادة الغضروفية، وكذلك الكثير من الدهون (Conjugated

lipids) . مكونات أخرى مثل سيتوبلازم الغالبية العظمى من الخلايا وبالذات العضلية المنقبضة، تمتاز بأنها ليست حمضيا أو قاعديا، وإنما يعتبر بمثابة بروتينات حمضية قاعدية (متبدلة) (Amphoteric) أي تبعا لطبيعة الأس الهيدروجيني لسائل السيتوبلازم. وهناك مكونات ثالثة مثل الكولاجين (Collagen) وسيتوبلازم خلايا الدم الحمراء والحبيبات الموجودة في خلايا الدم البيضاء الحمضية Eosionophil) (leucocytes تعتبر بمثابة مكونات قاعدية.

تعزى الطبيعة الحمضية لكل من (DNA وRNA) والدهون الفوسفورية إلى مجاميع الفوسفور (Phosphoric groups) الموجودة في كل مكون. أما الطبيعة الحمضية التي تمتاز بها السكريات المتعددة المخاطية (Mucopolysaccharides) في الغضاريف وبعض من الإفرازات المخاطية تنسب إلى مجموعات الكبريتات والكربوكسيل فيها. لهذا تعرف مثل هذه المكونات الخلوية الحمضية بمحبة الأصباغ القاعدية (Basophlilic) نظرا لأن مثل هذه المكونات لا تصطبغ إلا بالأصباغ القاعدية (Basic dyes). وكما شرح آنفا فإن التفاعل يتم على شكل ترابط بين الشحنات السالبة للمكونات الحمضية مع الشحنات الموجبة في الصبغات القاعدية بالبروتينات الحمضية القلوية لأن تفاعلها مع الأصباغ يعتمد كثيرا على التوازن بين مكوناتها من الحموض الأمينية الحمضية (Acidic amino acids) مثل الأسبارتيك (Asparatic) والجلوتاميك (Glutamic) والحموض الأمينية القاعدية (Basic amino acids) مثل الليسين (Lysine) والأرجنين (Arginine) وهذه البروتينات الحمضية القاعدية إذا وجدت في وسط حمضي فإن الحموض الأمينية القاعدية تصبح موجبة الشحنة كما في ($-NH_3^+$) وإذا وجدت في وسط قاعدي فإن الحموض الأمينية الحمضية تتأين وتصبح سالبة ($-COO^-$) . لهذا يمكن صبغ المكونات الخلوية المتبدلة (الحمضية القاعدية) بالأصباغ الحمضية أو القاعدية على السواء بعد التحكم في قيمة الرقم الهيدروجيني. عمليا يمكن للدارس أن يصبغ المادة الكروماتينية دون السيتوبلازم إذا استعمل صبغة قاعدية مذابة في محلول حمضي مثل صبغة أخضر المثايل (Methyl green) والمذابة في حمض الخليك المخفف لهذا تتلون مادة الكروماتين الحمضية أساسا بصبغة أخضر المثيل لكن السيتوبلازم ذا الطبيعة الحمضية القاعدية (المتبدلة) سوف يكتسب طبيعة قاعدية من المحلول

الحمضي، وهذا سوف ينعكس بدوره على عدم قدرة الصبغة القاعدية على التفاعل مع مادة السيتوبلازم، ولذا يبدو عديم اللون.

أما المكونات الخلوية القاعدية مثل الكولاجين (Collagen) ، والمعروف أنه بروتين قاعدي، فتعزى قلويته إلى احتوائه على حموض أمينية قاعدية مثل الجلايسين(Glycine) والهستدين (Histidine) ، لذا نجد أنه يتفاعل مع الأصباغ الحمضية.

لكن هناك أصباغ معينة لها القدرة على صبغ بعض المكونات النسيجية بلون يختلف عن اللون الذي تبدو عليه في محاليلها، مثل هذا النوع من الأصباغ تعرف بالأصباغ متغيرة اللون (Metachromatic dyes). فعملية تغير اللون ذاتها تعرف بالتحول اللوني (Metachromasy). أما المواد الخلوية التي تصطبغ فتسمى بالمواد محولة اللون (Chromotoropes). الجدير معرفته أن هذه الأصباغ المتحولة ذات طبيعة قاعدية وتتفاعل مع محولات اللون الحمضية. الغريب أن التغير اللوني الذي تحدثه هذه المحولات اللونية دائما يكون في نفس النمط، فالصبغة الخضراء (Green dye) تتحول إلى زرقاء والصبغة الزرقاء تتحول إلى حمراء، أما الصبغة الحمراء فتتحول إلى اللون البرتقالي أو الاصفر، هذا يعني أن الامتصاص العالي للأصباغ يسير في اتجاه الموجات قصيرة الطول لكن الحقيقة الفعلية للتحول اللوني لا تزال غير واضحة المعالم تماما. ويعتقد أن الأصباغ متحولة اللون لديها الميل لتشكيل ثنائيات (Demeric) أو متبلمرات (Polymers) لونية في محاليلها المائية. أما محولات اللون فتبدو أنها مواد تفضل وبشدة هذا الاشكال الثنائية أو المتبلمرة من الصبغة وتنظمها على سطوحها بمسافات مناسبة، ويعزى التحول اللوني إلى مثل هذا الترتيب الخاص.

وبما أن الغالبية العظمى للمكونات الخلوية عادة تتفاعل لكن بدرجة متفاوته مع أية صبغة سواء كانت قاعدية أو حمضية، فلقد استغلت مثل هذه الظاهرة إلى تحديد مدة الصبغ بحيث يصبغ نوع معين من المكونات الخلوية قبل بقية المكونات الأخرى. مثل هذه العملية تعرف بالصبغ المتدرج (Progressive dyeing). لكن لو سمح

للمكونات بالتفاعل مع الصبغة حتى تصطبغ جميع المكونات ثم أزيل الزائد من الصبغة بالتدريج فإنه بالإمكان تحت المراقبة المجهرية التحكم في شدة الصبغة المختصة بدرجة تجعل بعض المكونات الخلوية ذات صبغ جيد وبينها الآخر عديم الاصطباغ تماما، هذا الصبغ يعرف بالصبغ الرجعي (Regressive dyeing) أو بصبغ التمايز أو التفريق (Differentiation). عموما تستعمل الأصباغ القاعدية في عمليات الصبغ الرجعي عند استعمال الحموض كعوامل مفرقة والتي تجعل المكونات الحمضية القاعدية (Amphoteric) ذات طبيعة قاعدية، وهذا يجبرها على الانفصال عن الأصباغ القاعدية. المحاليل القلوية يمكن استعمالها كذلك في عملية التمايز مع الأصباغ الحمضية، كما أن عملية التمايز يمكن أن تتم بمعالجة النسيج المصبوغ بمحلول يحد من عملية التأين لكنه يستطيع أن يذيب الصبغة. يعتبر الكحول الأثيلي من المحاليل المناسبة للتمايز لأن لديه القدرة على إذابة الصبغة بشكل سريع وبالذات من المكونات النسيجية ضعيفة الصبغ. بهذا يمكن التحكم في كمية الصبغة حسب الرغبة بعدها يجب إزالة آثار الكحول المذيب بأي محلول آخر لا تذوب فيه الصبغة مثل الزيلول حتى يظل المكون التركيبي المطلوب في حالة جيدة من الصبغ.

التركيز

لا شك أن تركيز المادة الخلوية له دور لا بأس به في عمليات الصبغ، فمدة الاصطباغ تزداد كلما زاد تركيز المادة الخلوية في العينة، فلو احضرنا قرصين ٥٪ و٢٠٪ من مادة الجيلاتين وثبتناهما بالفورمالدهيد ثم قطعناهما إلى شرائح رقيقة ولكن بنفس السمك. لو صبغنا مثل هذه الشرائح بصبغة واحدة ولمدة زمنية واحدة فإن القطعة التي بها ٢٠٪ جيلاتين حتما سوف تمتص كمية أكبر من الصبغة لاحتوائها على مواد قابلة للصبغ بتركيز أعلى.

النفاذية

إن كمية الصبغة الممتصة من قبل أي مكون خلوي في مدة محددة لا تعتمد على تركيز المادة، أو على شحنات المجموعات المتفاعلة فقط، بل تعتمد أيضا على مدى

سهولة نفاذ الصبغة وسرعة وصولها إلى التركيب الخلوي. كما تتفاوت الأصباغ فيما بينها كثيرا فمنها سريع النفادية ومنها العكس، ويمكن إثبات ذلك بالتجربة. لو أخذنا عدة أنابيب تحتوي على تركيز ثابت من مادة الجيلاتين وأضفنا إليها أصباغ مختلفة ذات تركيز واحد لوجدنا سرعة الانتشار تتفاوت على حسب طبيعة الصبغة. تعتبر صبغة الإيوسين (Eosin) وصبغة البرتقالي (ج) (Orange G) من الصبغات سريعة النفاذية، بينما صبغة أزرق المثيل (Methyl blue) تعتبر من الصبغات بطيئة النفاذية. كما يعتقد أن الصبغات سريعة النفادية لها القدرة على الذوبان على شكل أيونات مفردة بينما الصبغات بطيئة النفاذية تميل إلى تكوين محاليل غروية.

بيئات اللصق

● مقـدمـة ● الـراتنجـات الـطبيعيـة
● الراتنجات المصنعة

مقـــدمة

إن الهـدف النهـائي الذي يجب أن تكون عليه القطاعات النسيجية أو الخلايا المصبوغة على الشرائح المجهرية هو المحافظة عليها بشكل دائم (Permanent) لتسهيل عملية فحصها وخزنها دون تغير ملحوظ في لونها أو شكلها. لهذا تستخدم عادة بيئات خاصـة للصق غطاء الشريحـة (Cover-slip) جيدا على القطاع أو الخلايا المثبتة فوق الشريحة المجهرية. بيئات اللصق هذه يجب أن تنفرد بمميزات خاصة، فلا تغير من طبيعة لون الصبغة للنسيج أو الخلايا كما توفر عملية لصق جيدة لغطاء الشريحة وأن يكون معامل انكسارها (Refractive index) مساوى أو مقارب لمعامل انكسار العينة الموجودة على الشريحة. في الوقت الحاضر يوجد العديد من بيئات اللصق، فقد تكون مادة راتنجنية طبيعية (Natural resin) (مـادة صمغية تسيل من بعض الأشجار عند قطعها أو جرحها). وقد تكون مادة راتنجنية مصنعة (Synthetic resin) أو بيئة لاصقة مائية (Aqueous mounting medium). أما عملية اللصق ذاتها فتتم بوضع قطرة مناسبة من المـادة الـلاصقة على القطاع أو الخلايا الموجودة على الشريحة بعدها يوضع غطاء الشريحة ويحذر شديد حتى لا تتكون أية فقاقيع هوائية (Air-bubbles) بين الشريحة وغطائها.

الراتنجات الطبيعية Natural Resins

يستخرج هذا النوع من البيئات اللاصقة من مصادر طبيعية مثل مادة بلسم كندا (Canada balsam) أو مادة الإيوبارال (Euparal). النوع الأول مادة شائعة الاستعمال، وتذوب جيدا في الزيلول، لذا يجب نزع الماء وكذلك الكحول من العينة وتشبعها بالزيلول قبل استخدامها كمادة لاصقة، يبلغ معامل الانكسار لمادة بلسم كندا حوالي ١,٥٢، لكن من أهم عيوبها أنها تتحول إلى اللون الأصفر مع الزمن كما أنها تجف وتنكسر وتغير من لون النسيج مع مرور الزمن أيضا. أما مادة الإيوبارال (Euparal) فهي الأخرى مادة تستخرج من مصادر طبيعية (صمغ الأشجار) وتذاب في الكحول وتمتاز بأنها أكثر صلابة من مادة بلسم كندا، ولا تسبب أي تغير لوني لصبغة النسيج والخلايا. يمكن استخدام هذه المادة اللاصقة مباشرة مع سحبات الدم والخلايا المحضرة بطريقة الهرس أو السحب أو النشر لكن بعد ما تجف مثل هذه التحضيرات تماما. أما في حالة القطاعات النسيجية فيتحتم أن ينزع الماء منها حتى تصل إلى الكحول ٩٥٪ فقط بعدها يمكن استعمال هذه المادة اللاصقة. أما المواد التي تدخل في تركيب مثل تلك المادتين اللاصقتين فهي كالتالي:

مادة بلسم كندا:

تتركب مادة بلسم كندا من المواد الآتية:

التربينات	Terpenes
حمض كربوكسيلي	Carboxylic acid
صمغ دمار	Gum damer
صمغ السندروس	Gum sandarac

مادة الإيوبارال

تتركب هذه المادة من المكونات الآتية:

زيت الإوكاليبوس	Oil of eucalyptus
صمغ السندروس	Gum sandarac
سالول	Salol

بارالدهيد	Paraldehyde
منثول	Menthol
كافور	Camphor

الراتنجنات المصنعة Synthetic Resins

تمتاز الراتنجنات المصنعة أو المركبة على الطبيعة بأنها أكثر ثباتا (Stable) ، وبأنها خاملة (Inert) ، وتذوب جيدا في الزيلول والتولوين (Toluene) ، وتجف بسرعة، وتلتصق جيدا بالزجاج، كما تمتاز بلونها الشاحب (Pale) والذي لا يصفر مع مرور الزمن وبالإمكان تحديد مكوناتها بشكل دقيق. ومن أهم مميزاتها أيضا أن معامل انكسارها مناسب للفحص المجهري والذي يتراوح عادة فيما بين ١,٥٣ إلى ١,٥٤ . ولعل من أشهر الراتنجنات المصنعة ما يعرف بالبرماونت (Permount) والبيكوليث (Piccolyte) وراتنج هارليكو المصنع (Harleco synthetic resin (HRS)) والكليرماونت (Kleermount) والهستوكلاد (Histoclad). كما أن البروتكس (Pro-texx) والناماونت (Namount) والبرزيرفاسلايد (Preservaslide) تعتبر من الراتنجنات المصنعة. في الحقيقة لا نستطيع أن نفاضل بين تلك البيئات نظرا لتكافئها في الجودة، فجميعها تذوب في الزيلول أو التولوين أو المذيبات الهيدروكربونية العطرية (Aromatic hydrocarbon).

البيئات اللاصقة المائية أساسية لحفظ المكونات النسيجية وصبغاتها التي عادة تذوب في الكحولات أو الهيدروكربونات. لكن البيئات اللاصقة المائية تشترك في أن مكوناتها تتكون عادة من ثلاثة عناصر رئيسية وهي :

١ ـ الجيلاتين (Gelatin) والصمغ العربي (Gum arabic) يستعمل كعامل تقوية (Soldifying agent).

٢ ـ السكر (Sugar) والأملاح (Salts) تستعمل لزيادة معامل الانكسار (Refractive index).

٣ ـ الجلسرول (Glycerol) لكي يحمى العينة من الجفاف أو التكسر.

كما تحتوي البيئة اللاصقة المائية عادة على مادة حافظة (Preservative) مثل الفينول (Phenol) وحمض الكـــربـــوليك (Carbolic acid) والثيمـــول (Thymol) والمـرثيوليت (Merthiolate) والزيفران (Zephiran) وذلك لمنع نمو فطريات التعفن (Mold growth) ومن أشهر البيئات اللاصقة المائية ما يلي :

جيلاتين الجلسرين القيصري Kaiser glycerine jelly

ماء مقطر	٥٢ مل
جيلاتين	٨ جم
جلسرين	٥٠ مل
فينول	٠,١ جم

يترك الجيلاتين في الماء لمدة ساعتين، يضاف بعدها الجلسرين والفينول ثم ترفع درجة حرارة المحلول حتى ٦٥ ـ ٧٠°م، ويحرك المحلول لمدة ١٥ دقيقة حتى يتجانس تماما.

يمكن حفظ مثل هذه البيئة في زجاجة جيدة الإحكام وعند درجة حرارة الثلاجة. لو زادت درجة حرارة المحلول عن ٧٥°م فإن الجيلاتين يتحول إلى ما يعرف ما بعد بالميتاجيلاتين (Metagelatin) ، وهذا النوع الأخير لا يتصلب ويبلغ معامل انكسار هذه البيئة ١,٤٢ عند درجة حرارة الغرفة.

بيئة آباثى Aputhy's medium

صمغ عربي	٥٠ جم
سكروز	٥٠ جم
ماء مقطر	٥٠ مل
ثيمول	٠,٠٥ جم

يذاب الصمغ العربي في ماء دافىء ثم يضاف السكروز وعند تمام الذوبان يرشح

المحلول ويترك ليبرد ثم تضاف المادة الحافظة مثل الثيمول. يبلغ معامل انكسار هذه البيئة ١,٥٢.

بيئة فرانت Farrant's medium

صمغ عربي	٤٠ جم
جلسرين	٤٠ مل
ماء مقطر	٤٠ مل
فينول	٠,١ جم

يذاب الصمغ العربي في الماء أولا ثم يضاف إليه الجلسرين والمادة الحافظة مثل الفينول ويبلغ معامل الانكسار لهذه البيئة ١,٤٢.

بيئة قراي ووس Gray and Wess medium (PVA)

كحول البوليفينايل	٢ جم
جلسرين	٥ مل
٧٠٪ أسيتون	٧ مل
حمض اللبن	٥ مل
ماء مقطر	١٠ مل

تعمل عجينة من الكحول والأسيتون ثم تمزج نصف كمية الماء المقطر مع الجلسرين مع التحريك المستمر، ثم تضاف كمية الماء المتبقية قطرة قطرة مع الاستمرار في التحريك. لون المحلول سوف يكون عكرًا لكن يستحسن تدفئته لمدة عشر دقائق في حمام مائي حتى يصبح لونه رائقا.

الفصل السابع عشر

المحاليل المنظمة

● مقدمة ● محلول حمض الخل/ الخلات ● محلول الكاكوديلات ● محلول الفوسفات ● محلول الترس ● محلول خلات الفيرونال

مقدمة

من المعروف أن الأس الهيدروجيني (pH) للخلايا يلعب دورا مهما في سرعة التفاعلات الكيميائية الحيوية، وأي تغير طفيف في قيمة الأس الهيدروجيني قد يكون ذو تأثير بالغ على سرعة مثل هذه التفاعلات. لذا نجد أن الخلايا الحية تمتاز بميكانيكية فريدة تعمل دائما على المحافظة على طبيعة الأس الهيدروجيني من خلال تفاعلات كيميائية تتحكم فيها محاليل يطلق عليها اسم المحاليل المنظمة (Buffers). ولكي نفسر أهمية المحاليل المنظمة لابد من التطرق لشرح المثال التالي.

لو فرضنا أن لدينا محلولا منظما مكونا من حمض الكربونيك (Carbonic acid, H_2CO_3) وبيكربونات الصوديوم (Sodium bicarbonate, $NaHCO_3$).

حمض الكربونيك من الحموض ضعيفة التأين، ويوجد دائما في حالة متعادلة على الشكل الآتي:

$$H_2CO_3 \rightleftarrows H^+ + HCO_3^-$$

أما البيكربونات فهي الأخرى تتأين كما في المعادلة التالية:

$$NaHCO_3 \rightleftarrows Na^+ + HCO_3^-$$

لو أضفنا أيونات هيدروجين (H^+) إلى هذا المحلول فحتما سوف تتحد مع أيونات البيكربونات(HCO_3^-) مكونة حمض كربونيك لكي يبقى تركيز أيونات الهيدروجين ثابتا

في المحلول. أما لو أضفنا أيونات الهيدروكسيل (OH^-) فإنها ستتحد مع أيونات الهيدروجين مكونة ماء، وينجم عن تأين حمض الكربونيك معطيا أيونات هيدروجين تحل محل تلك المتفاعلة مع الهيدروكسيل لكي يعود تركيز أيونات الهيدروجين إلى الوضع الأصلي. وبهذا يعتبر حمض الكربونيك كمخزن إمداد لأيونات الهيدروجين لو استخدمت القواعد، أما البيكربونات فتتحد مع أيونات الهيدروجين عند إضافة زيادة من الحمض. وتجدر الاشارة إلى أنه يفضل دائما تحضير المحاليل المنظمة في مكان تمتص فيه الأبخرة بعيدًا وحالاً والمعروف بـ (Fume hood).

أنواع المحاليل المنظمة

١ ـ محلول حمض الخل/ الخلات المنظم Acetic Acid/ Acetate Buffer (Walpole)

ا ـ ٠,٢ جزيء حمض الخل (١١,٥٥ مل/ ١ لتر).

ب ـ ٠,٢ جزيء خلات صوديوم (٢٧,٢٥ جم CH_3COONa) في ١ لتر).

كما هو مبين في الجدول تضاف الحجوم من محلولي ا، ب ويكمل الحجم النهائي إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر، لكي يعطي الأس الهيدروجيني المطلوب:

محلول ا (مل)	محلول ب (مل)	الأس الهيدروجيني pH
٤٦,٣	٣,٧	٣,٦
٤٤,٠	٦,٠	٣,٨
٤١,٥	٩,١	٤,٠
٣٦,٨	١٣,٢	٤,٢
٣٠,٥	١٩,٥	٤,٤
٢٥,٥	٢٤,٥	٤,٦
٢٠,٤	٣٠,٦	٤,٨
١٤,٨	٣٥,٣	٥,١
١٠,٥	٣٩,٥	٥,٢
٨,٨	٤١,٢	٥,٤
٤,٨	٤٥,٢	٤,٨
٠,٧٥	٤٦	٦,٥

٢ ـ محلول الكاكوديلات المنظم (Plumel) Cacodylate Buffer

وهذا المنظم غالبا ما يستخدم لتعديل الأس الهيدروجيني للالدهيدات المستخدمة في تثبيتات عينات المجهر الإلكتروني، ويجب الاحتراس من هذا المحلول لأنه سام لما يحتويه من الزرنيخ . وتحضيره كالآتي :

محلول ا ـ ٢ , ٠ جزىء كاكوديلات الصوديوم $(Na (CH_3)_2 AsO_2 \cdot 3H_2O)$ ٤٢,٨ جم ويكمل الحجم إلى ١٠٠٠ مل بالماء المقطر.

محلول ب ـ ٢ , ٠ جزىء حمض الهيدروكلوريك (١٠ مل حمض الهيدروكلوريك المركز (٣٦ ـ ٣٨٪) ويضاف إليها ٦٠٥ مل ماء مقطر) .

يضاف الحجم المبين في الجدول من محلول (ب) إلى ٥٠ مل من محلول (أ) ثم يكمل الحجم الكلي إلى ٢٠٠ مل بالماء المقطر للحصول على الأس الهيدروجيني المطلوب .

محلول ب (مل)	الأس الهيدروجيني
٤٧,٥	٥,٠
٤٣,٠	٥,٤
٣٩,٢	٥,٦
٣٤,٨	٥,٨
٢٩,٦	٦,٠
١٨,٣	٦,٤
١٣,٣	٦,٦
٩,٣	٦,٨
٦,٣	٧,٠
٤,٢	٧,٢
٢,٧	٧,٤

٣ ـ محلول الفوسفات المنظم (Srensen) Phophate Buffer :

ا ـ ٠,٠٦٧ جزيىء فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (أرثو فوسفات البوتاسيوم KH_2PO_4) ٩,١٨ جم في ١ لتر.

ب ـ ٠,٠٦٧ جزيىء فوسفات الصوديوم الهيدروجينية (أرثو فوسفات الصوديوم Na_2HPO_4) ١١,٨٨ جم في ١ لتر.

للحصول على أس هيدروجيني معين يضاف إلى الحجوم المذكورة في الجدول من محلول (ب) كمية كافية من محلول (ا) ليصبح الحجم ١٠٠ مل عند درجة حرارة الغرفة ٢٥°م.

محلول ب (مل)	الأس الهيدروجيني
١,٢	٥,٠
٢,٠	٥,٢
٣,٣	٥,٤
٥,٥	٥,٦
٨,١	٥,٨
١٢,٣	٦,٠
١٨,٥	٦,٢
٢٦,٨	٦,٤
٤٩,٢	٦,٨
٦١,٠	٧,٠
٧١,٥	٧,٢
٨٠,٤	٧,٤
٨٦,٨	٧,٦
٩١,٤	٧,٨
٩٤,٥	٨,٠
٩٦,٧	٨,٢

٤ ـ محلول ترس المنظم TRIS Buffer (Gomori)

ا ـ ٢ , ٠ جزيء من ترس Tris (hydroxymethyl) aminomenthane ٣٥ , ٣٠ جم .

ب ـ ٢ , ٠ جزيء حمض الهيدروكلوريك (١٠ مل حمض مركز وتكمل إلى ٦١٥ مل بالماء المقطر) .

كما في الجدول التالي، يضاف إلى محلول (ب) ٥٠ مل من محلول ا ومن ثم يكمل الحجم إلى ٢٠٠ مل من الماء المقطر للحصول على الأس الهيدروجيني المطلوب . لكن من الجدير بالذكر أن هذا المحلول المنظم لا يمكن استخدامه لتعديل أس الألداهيدات الهيدروجيني .

محلول ب (مل)	الأس الهيدروجيني	محلول ب (مل)	الأس الهيدروجيني
٤٤,٣	٧,٢	٢٢,٠	٨,٢
٤١,٧	٧,٤	١٦,٥	٨,٤
٣٨,٤	٧,٦	١٢,٢	٨,٦
٣٢,٩	٧,٨	٨,٦	٨,٨
٢٦,٨	٨,٠	٩,٥	٥,٠

٥ ـ محلول خلات الفيرونال المنظم Veronal-Acetate Buffer (Michaelis)،

ا ـ خلات الصوديوم ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) ١٩,٧٠ جم .

فيرونال الصوديوم ٢٩,٧٠ جم

Sodium Veronal (Sodium berbitone, Sodium diethyl barbiturate)

ب ـ ١ , ٠ جزيء حمض الهيدروكلوريك .

تذاب خلات الصوديوم وفيرونال الصوديوم في ١ لتر ماء مقطر، ثم يضاف الحجم المحدد من محلول (ب) إلى ٢٠ مل من محلول (ا) ويكمل الحجم إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر، للحصول على الأس الهيدروجيني المطلوب . مثل هذا المنظم لا يمكن استخدامه لتعديل الأس الهيدروجيني لمحاليل الألدهيدات .

محلول ب (مل)	الأس الهيدروجيني
٦٤	٢,٦٢
٦١	٣,٣٠
٥٦	٣,٦٢
٥٢	٣,٨٨
٤٨	٤,١٣
٤٤	٤,٣٣
٤١	٤,٦٦
٣٦	٤,٩٣
٣٢	٥,٣٣
٢٨	٦,٢٢
٢٤	٦,٩٩
٢٢	٧,٢٠
٢١	٧,٤٠
١٦	٧,٦٦
١٢	٧,٩١
٠٨	٨,١٨
٠٤	٨,٥٥
٠٣	٨,٦٨
٠٢	٨,٩٥

الفصل الثامن عشر

المحاليل الملحية المتزنة

● مقدمة ● محلول الجراد المتزن ● المحلول الملحي للبرمائيات ● محلول رنجر للثدييات ● المحلول الملحي لزراعة النباتات الزهرية

مقدمة

المحلول الملحي الحقيقي هو ذلك المحلول الذي تنسجم فيه الأنسجة وتسلك وكأنها في الكائن الحي. هذه المحاليل المتزنة تكون عادة بسيطة التركيب ويمكن استخدام السوائل الحيوية (Biological fluids) كالدم والمستخلصات النسيجية (Tissue extracts) كمحاليل متزنة. لكن بعض من السوائل الدموية مثل دم الحشرات وبعض القواقع تتحلل بملامستها الهواء، لذلك تستخدم المحاليل المتزنة عند دراسة أنسجة تلك المجموعة الحيوانية.

في حالة الدم الممكن استخدامه كمحلول متزن يحضر في أنابيب، يبرد جيدا في الثلج لكي نوقف عملية التجلط ثم يسخن الدم إلى ٦٠°م لمدة خمس دقائق. بعد ذلك يحفظ في الثلاجة عند درجة حرارة أقل من الصفر المئوى لمدة حوالي ١٢ ساعة، بعدها يخرج من الثلاجة ويترك يذوب ثم يطرد مركزيا عند قوة ٦٠٠٠ جم لمدة عشر دقائق، ويستخدم السائل في أنابيب الطرد المركزي كمحلول متزن.

ماء البحر أيضا ممكن استخدامه كمحلول متزن لكثير من الأغراض في حالة أنسجة الأحياء البحرية.

أنواع المحاليل

نظرا لأهمية مثل هذه المحاليل سوف نسرد بعض المحاليل المستخدمة لكائنات حية مختلفة منها:

١ ـ محلول الجراد المتزن Locust Ringer (Weis-Fogh 1956)

يتركب هذا المحلول من المواد التالية:

كلوريد الصوديوم (NaCl)	٢٩,٢ جم/١ لتر	٢١٠ مل
كلوريد البوتاسيوم (KCl)	٣٧,٣ جم/١ لتر	٠٢٠ مل
أرثوفوسفات الصوديوم ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)	٧٨ جم/١ لتر	٠٣٠ مل
هيبوفوسفات الصوديوم ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	٨٩,٥ جم/١ لتر	٠٧٠ مل
كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2 \cdot 6H_2O$)	٢١,٩ جم/١ لتر	٠٢٠ مل
كلوريد المغنيسيوم ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	٢٠,٣ جم/١ لتر	٠٢٠ مل

ثم يكمل الحجم إلى ١ لتر بالماء المقطر ومن ثم يمكن إضافة البنسلين (Penicillin) بواقع ٣٠ مجم/لتر، ويخلط المحلول جيدا لكي يعطي أس هيدروجيني ٦,٧.

٢ ـ المحلول الملحي للبرمائيات

يتركب هذا المحلول من المكونات التالية:

كلوريد الصوديوم NaCl	٥,١٥٠ جم
كلوريد البوتاسيوم KCl	٠,٠٧٥ جم
كبريتات المغنيسيوم المائية $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	٠,٢٠٤ جم
نترات الكالسيوم المائية $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	٠,٠٧٨ جم
كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$	٠,٠٤٥ جم
هيبو فوسفات الصوديوم Na_2HPO_4	٠,٠٣٠ جم
أرثو فوسفات البوتاسيوم KH_2PO_4	٠,٠٣٧ جم
كربونات الصوديوم $NaHCO_3$	٠,٧٥٠ جم

يذاب هذا الخليط في لتر واحد من الماء المقطر.

٣ ـ محلول رنجر للثدييات

يتكون هذا المحلول من المواد الآتية :

كلوريد الصوديوم $NaCl$	٦,٨
كلوريد البوتاسيوم KCl	٠,٤ جم
كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$	٠,٢ جم
كربونات الصوديوم $NaHCO_3$	٢,٢ جم
أرثو فوسفات الصوديوم NaH_2PO_4	٠,١١ جم
جلوكوز $C_6H_{12}O_6$	١,٠٠ جم

يذاب هذا الخليط في لتر واحد من الماء المقطر ثم يضاف ٠,١ جم من كبريتات المغنيسيوم ($MgSO_4$) وبعدها يرشح المحلول.

٤ ـ المحلول الملحي لزراعة النباتات الزهرية (Pfeffer)

يتركب هذا المحلول من المكونات التالية :

نترات الكالسيوم المائية $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	٤ جم
نترات البوتاسيوم KNO_3	١ جم
كبريتات المغنيسيوم المائية $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	١ جم
أرثو فوسفات البوتاسيوم KH_2PO_4	١ جم
كلوريد البوتاسيوم KCl	٥ جم
كلوريد الحديديك $FeCl_3$	٠,١ جم

ثم يذاب هذا الخليط في ٣ ـ ٧ لتر من الماء المقطر.

قائمة ببعض المحاليل الملحية المستخدمة للكائنات الحية المختلفة (عن Grimstone & Skaer, 1972)

الكائن الحي	مكونات المحلول الكيميائية (الأوزان جميعها بالجرام من الأملاح اللامائية)							ملاحظات
	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$NaHCO_3$	NaH_2PO_4	$MgCl_2$	Glucose	
دودة الأرض (Roots, 1955)	٤,١	٠,٠٨٢	٠,٠٨٤	٠,٢٨	–	–	–	–
قوقع الميلكس (Kerkut & Laverack, 1952)	٨,٦	٠,٢١	٠,٣٤	–	–	٠,١٣	–	أضف ٠,١٩ جم من KH_2PO_4
القشريات البحرية (Hagowara & Bullock, 1957)	٢٦,٤	١,١٢	٢,٧٨	–	–	٠,١٧٨	–	أضف ٠,٤٨ جم $MgSO_4.7H_2O$ + ٠,٥٥ جم H_3PO_3 ومن ثم ثم عدل الرقم الهيدروجيني إلى pH7 مستعملاً NaOH
محلول الحشرات المتزن	٧,٥	–	–	–	–	–	–	–
محلول الصرصور المتزن (Yamasaki & Narahashi, 1959)	١٢,٢٨	٠,٢٣	٠,٢	–	٠,٠٣	–	–	أضف ٠,٢٥ جم Na_2HPO_4
محلول الحشرات ثنائية الأجنحة	٧,٥	١,٥	٠,٢٢	–	٠,٨	٠,١٩٢	١,٨	أضف ٠,٥ جم من Na Glutamate + ٠,٣٧ جم حمض السيترك ثم عدل الـ pH إلى ٧ مستخدما NaOH
سلحفاة المياه العذبة (Young, 1933)	٥,٥	٠,١٤	٠,١٢	–	–	–	–	عدل الرقم الهيدروجيني بواسطة الفوسفات أو البيكربونات.
سلحفاة المياه المالحة (Forster & Hong, 1958)	٧,٨	٠,١٨	٠,١٦٦	٠,٠٨٤	٠,٠٦	٠,٠٩٥	–	–
محلول جنين البرمائيات المتزن (Holtfreter, 1943)	٣,٥	٠,٠٥	٠,١	٠,٢	–	–	–	–
محلول جنين الدجاج المتزن (Ringer)	٩,٠٠	٠,٤٢	٠,٢٤	–	–	–	–	–
محلول الثدييات المتزن	٩,٠	–	–	–	–	–	–	–
محلول رنجر للنباتات	٧,٥	٠,٠٧٥	٠,١	٠,١	–	–	–	–

الملاحق

الملحق رقم (١)
أشهر معدات التحضيرات المجهرية

● أدوات التشريح ● أجهزة القطع الدقيق
● أجهزة التبريد ● أجهزة التسخين ● أجهزة
أخرى ● أجهزة الطرد المركزي

لقد أصبح من المعروف أن التحضيرات المجهرية تعتمد على المعدات أو الأجهزة العلمية، وكذلك الطرق التحضيرية الواجب استعمالها حتى يتسنى للدارس معرفة ماهية التراكيب الخلوية للكائن الحي.

على هذا الأساس أصبح من الواجب ذكر لمحة مبسطة عن أشهر المعدات الواجب توفرها في معامل التحضيرات المجهرية مثل معدات القطع والتبريد والفصل.

أجهزة القطع Cutting Instruments

تعتبر اليوم معدات القطع من اللوازم الأساسية التي لا يستغنى عنها في معامل الأحياء، وهي عبارة عن تلك الأدوات اللازمة أثناء تحضير وإعداد العينة للفحص المجهري. يمكن تصنيف معدات القطع إلى نوعين رئيسين هما:

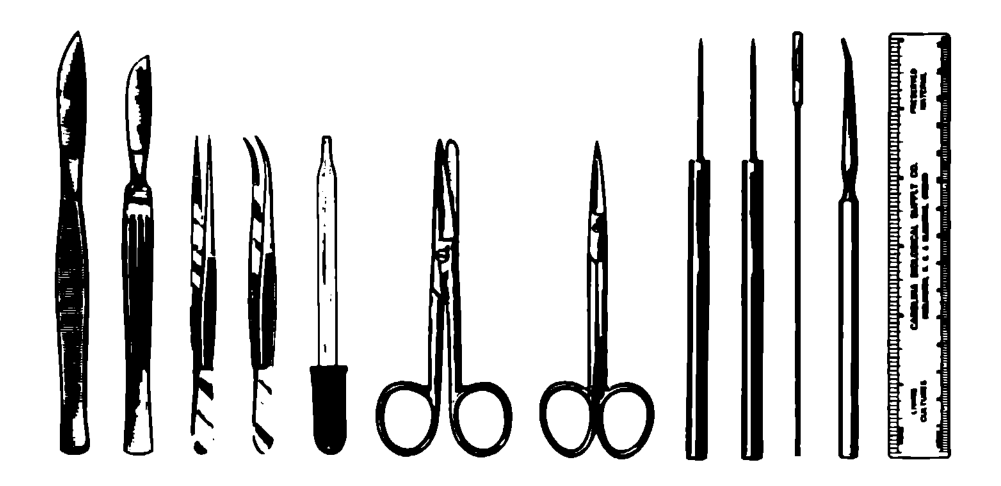
ا ـ أدوات التشريح Dissecting tools

ب ـ أجهزة القطع الدقيق Microtomes

أدوات التشريح

من المعروف أن معدات التشريح تستخدم في المراحل الأولى أثناء الحصول على العينة من الكائن، فالمقصات (Scissors) تستعمل لتشريح الحيوان وتقطيع الأجزاء

المـراد دراستهـا، بينـما المـلاقط (Forceps) تساعد في عمليات الإمساك والنقل، أما المشارط (Scalpels) فعادة تُستخدم كأداة مساعدة للتقطيع أثناء التشريح. إبر التشريح (Dissecting needles) تستغل أثناء التشريح الدقيق للكائنات الصغيرة. أما الشفرات الحادة (Sharp blades) فهي مخصصة لتقطيع العينة إلى أجزاء صغيرة لا تزيد عن ٢ سم وهذا يسهل عمليات التثبيت فيما بعد (شكل ١).



شكل ١ نموذج لأدوات التشريح.

أجهزة القطع الدقيق (الميكروتوم)

الميكروتوم عبارة عن جهاز خاص لعمليات القطع وتجزأة العينة المراد دراستها تحت المجهـر الضوئي أو الإلكتروني. لهذا تمتاز الميكروتومات الحديثة بقدرتها الفائقة على عمل قطاعات رقيقة جدا (Thin sections) تسمح للضوء من النفاذ من خلالها، حيث أن عملية نفاذ الضوء من خلال القطاع المراد فحصه أمر لابد منه عند استخدام المجاهر النفـاذة (Transmitted microscope). الجدير بالذكر أن العينة المراد تقطيعها غالبا ما تجمد أو تطمر في مادة خاصة كشمع البرافين مثلا حتى تسهل عملية التقطيع. هذا

يعني أن هناك علاقة بين جهاز الميكروتوم المستخدم ونوعية العينة إذا كانت مجمدة أو مطمورة في شمع البرافين أو السيلويدين (Celloidin) أو البلاستيك (Plastic). كما أن هناك علاقة وثيقة بين جهاز القطع وطبيعة العينة وأبعادها، طبيعة مادة الطمر وسمك القطاعات المراد الحصول عليها. يستنتج من السابق أن أجهزة الميكروتومات قد صنعت خصيصا للحصول على شرائح رقيقة جدا ومنفذة للضوء من العينة، لهذا يوجد العديد من الميكروتومات منها:

ا - الميكروتومات اليدوية Hand microtomes

ب - الميكروتومات الدوارة Rotary microtomes

جـ - الميكروتومات الثلجية Freezing microtomes

د - الميكروتومات الدقيقة Ultramicrotomes

الميكروتومات اليدوية

تعتبر هذه الميكروتومات من أبسط أنواع أجهزة القطع المعروفة، وتتكون أساسا من أسطوانة معدنية مجوفة مركزيا يبلغ طولها حوالي ١٠ سم، ويتراوح وزنها فيما بين نصف واثنان ونصف كيلوجرام. يوجد في قمة هذه الاسطوانة قرص أملس السطح أما نهاية الاسطوانة فتحتوي على لولب متحرك ومدرج. هذا اللولب المدرج وظيفته الأساسية التحكم في ارتفاع أو انخفاض العينة داخل تجويف الاسطوانة. كذلك يزود هذا الجهاز عادة بماسك خاص لربطه عند الرغبة على أسطح الطاولات ورفوف المعامل. هذا النوع من الميكروتومات قليل الاستعمال على الرغم من أنه قد يكون أكثر مناسبة للمدارس وأثناء الرحلات الحقلية (شكل ٢).

الميكروتومات الدوارة

هذه الأنواع من أجهزة القطع تملك قاعدة مسطحة ثقيلة (Heavy base plate) مثبت عليها جهاز القطع الأساسي المكون من الأجزاء الآتية:

ا - جهاز التحريك Driving system

ب ـ عجلة التحريك	Drive wheel
جـ ـ سكين القطع	Cutting knife
د ـ ضابط القطاعات	Section's adjustment
هـ ـ ماسك العينة	Specimen holder



شكل ٢ ميكروتوم يدوي.

جهاز التحريك عبارة عن مجموعة من التروس القابلة للدوران، وهذا بدوره يؤدى إلى تحريك قضيب معدني ينتهي بمكبس يربط بحامل العينة. تدار تروس جهاز التحريك بعجلة خاصة مزودة بمقبض، مثل هذه العجلة يطلق عليها اسم عجلة التحريك.

عملية دوران التروس تؤدى إلى تحريك القضيب المعدني من أعلى إلى أسفل، والعكس صحيح مع تقدم هذا القضيب باتجاه سكين القطع بشكل ثابت. يتم تحديد سمك القطاع المراد الحصول عليه من العينة بوساطة ضابط القطاعات المدرج الذي

يحدد مقدار تقدم القضيب المعدني باتجاه السكين في كل دورة كاملة لعجلة التحريك. بعد تثبيت العينة المراد تقطيعها على حامل العينة بشمع البرافين المنصهر مثلا، تربط في المكبس الخاص على طرف القضيب المتحرك ويمكن التحكم في توجيه مستوى العينة بلوالب مساعدة. سكين القطع هي الأخرى تربط بمكابس خاصة لتثبيتها بشكل قوى. هذه المكابس عادة تقع أمام القضيب المتحرك وبالإمكان تحريكها إلى الأمام أو إلى الخلف حسب الطلب حتى تكون قريبة جدا من العينة وبالإمكان أيضا التحكم في زاوية ميل السكين بلوالب خاصة (شكل ٣).



شكل ٣ ميكروتوم دوار (الصورة عن شركة American optical corporation)

الميكروتومات الثلجية

هذا نوع خاص من الميكروتومات لكنه لا يختلف عن الميكروتومات الدوارة في الأساسيات إلا بعملية التبريد المنخفضة جدا لغرفة التقطيع في هذا الجهاز. تستخدم

هذه الأجهزة في عمل القطاعات المستعجلة للأنسجة الطازجة أثناء عملية التشخيص أثنـاء القيام بالعمليات الجراحية في المستشفيات. كما تستخدم بشكل خاص في دراسات كيمياء الأنسجة وبالأخص عند الكشف عن الأنزيمات الخلوية التي تتأثر بالعمليات المعقدة والمتبعة في طرق تحضير القطاعات البرافينية بالطرق العادية. هذه الميكروتومات غالبا ما تكون كبيرة الحجم، وغرفة التقطيع تكون مغلقة بنافذة زجاجية مائلة مطمور بداخلها أسلاك حرارية تضمن عدم تكون الضباب عليها. هذه النافذة الزجاجية بالإمكان فتحها أو غلقها إنزلاقيا (نافذة إنزلاقية Sliding window) وعند عملية الفتح تضاء حجرة التبريد أوتوماتيكيا علما بأنه يمكن إضاءة هذه الحجرة يدويا أيضا بمفاتيح إضاءة خارجية.

عملية التبريد داخل غرفة القطع تكون في الغالب متجانسة نظرا لوجود منظم لتوزيع الهواء داخلها. كما يحتوي الميكروتوم على جميع الضوابط اللازمة مثل ضابط القطاعات وضابط درجة الحرارة ولوالب ربط العينة وسكين القطع. كما أنه بالإمكان إدارة هذا الجهاز إما يدويا أو آليا أثناء عملية التقطيع (شكل ٤أ، ب).

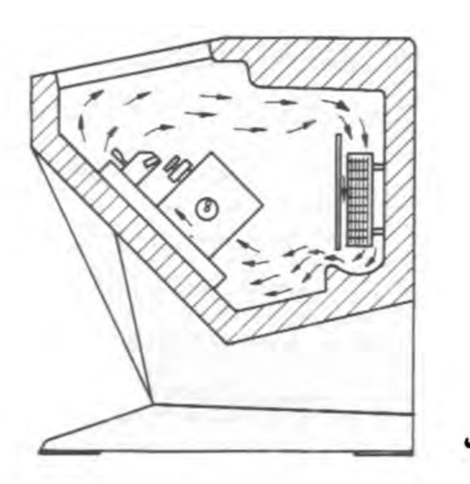
الميكروتومات الدقيقة

هذا النوع من الميكروتومات يستخدم في مجال المجاهر الإلكترونية لقدرته الفائقة في تقطيع العينة الى شرائح رقيقة جدا تصل إلى أجزاء من الميكرومتر. تمتاز هذه الأجهزة بأن سكين القطع فيها عادة تكون من الزجاج أو من الماس (Diamond knife) بدلا من المعدن وأن القطاعات تستقبل مباشرة بعد القطع في حوض مائي يثبت على سكين القطع. ولقد تطرقنا إلى عمل هذا النوع من معدات القطع بشيء من التفصيل في الباب الخاص بالمجهر الإلكتروني.

أجهزة التبريد Colling Instruments

يحتاج المشتغل في مجال التحضيرات المجهرية إلى أجهزة تبريد معينة تضمن نجاح العمليات التحضيرية مثل الثلاجة (Refrigerator) وسائل النتروجين (Liquid nitrogen)


أ


ب

شكل ٤ ميكروتوم ثلجي (عن شركة American optical corporation)
ا ـ الشكل العام ب ـ توزيع الهواء في الجهاز

وجهاز عمل الثلج الخاص (Dry-ice maker). فالثلاجة تعتبر اليوم ضرورية لحفظ السوائل والمحاليل الكيميائية التي تتأثر بالحرارة العادية. معظم المواد الكيميائية عادة يفضل حفظها عند درجة حرارة تتراوح فيها بين ١٠ ـ ٤°م لكن هناك بعض المحاليل التي يتطلب خزنها على شكل جوامد. أما النتروجين السائل فيستخدم في عمليات الخزن التي تحتاج إلى درجة حرارة منخفضة جدا (١٩٥° تحت الصفر) لتخزين الخلايا الحية والحيوانات المنوية. وعند دراسة الإنزيمات الخلوية. كذلك جهاز عمل الثلج الجاف يلعب دورا بارزا في مجال الدراسات الخلوية فهو مخصص لعمل مكعبات صلبة ومتجمدة من غاز ثاني أكسيد الكربون السائل والمضغوط في اسطوانات خاصة. هذه المكعبات المتجمدة تستخدم أثناء نزع غطاء الشريحة من على الشريحة أثناء عمليات الهرس الخلوي. عندما توضع الشريحة على هذه المكعبات الباردة جدا فإن محلول البيئة الخلوي سوف يتجمد على الشريحة وبالتالي تسهل عملية نزع غطاء الشريحة ميكانيكيا مما يضمن عدم التصاق الخلايا على هذا الغطاء.

أجهزة التسخين Heating Instruments

يحتاج المحضر أثناء العمل إلى مصدر حراري كالتسخين لإذابة بعض المواد غير القابلة للذوبان عند درجة حرارة الغرفة، أو لتجفيف الشرائح المجهرية، أو لصهر بعض المواد الصلبة مثل شمع البرافين. لذا يمكن اعتبار أن أهم معدات التسخين الواجب توفرها في معامل علوم الحياة ما يلي:

ا ـ الفرن (Oven) ويستعمل لصهر شمع البرافين.

ب ـ المجفف (Hot plate) ويستعمل لتجفيف الشرائح.

جـ ـ الموقد الغازي (Gas burner) ويستعمل لتسخين وغلي المحاليل.

د ـ الموقد الكحولي (Spirit burner) ويستعمل للتسخين اللطيف للشرائح أثناء عمليات الهرس.

أجهزة أخرى Other Instruments

اليوم يوجد العديد من الأجهزة الحديثة اللازم توفيرها في معامل التحضيرات

المجهرية كالميزان الكهربائي (Electric balance) أو جهاز قياس الأس الهيدروجيني (pH-meter instruments) وأجهزة الصبغ .

أجهزة الطرد (الفصل) المركزي Centrifuge Instruments

دارس الخلية يحتاج في كثير من الأحيان إلى ترسيب الخلايا المعلقة في المحاليل أو تحطيم الخلايا ثم فصل مكوناتها المختلفة كل على حدة أو إذابة بعض منها وترسيب البعض الآخر. لهذا أصبح من الضروري استعمال أجهزة خاصة للقيام بمثل هذا العمل، هذه الأجهزة تعرف باسم أجهزة الطرد المركزي وهي على ثلاث أنواع رئيسية :

ا ـ أجهزة الطرد المركزي اليدوية Hand centrifuges

ب ـ أجهزة الطرد المركزي الكهربائية العادية Electrical centrifuges

جـ ـ أجهزة الطرد المركزي هائلة السرعة Ultra-centrifuges

أجهزة الطرد المركزي اليدوية

تمتاز أجهزة الطرد المركزي التي تدار باليد بأنها صغيرة الحجم ورخيصة الثمن ولا تزيد سرعة دورانها عن ١٥٠٠ دورة في الدقيقة، لهذا تعتبر مناسبة لعمليات الترسيب البسيطة. ويمثل جهاز الطرد المركزي اليدوي أبسط أنواع أجهزة الطرد المركزية على الإطلاق، ويتكون من جهاز حركي يدار باليد، يبرز من هذا الجهاز قضيب تنتهي قمته بما يعرف برأس (Head) الجهاز الذي توضع فيه أنابيب الطرد المركزي المحتوية على المحلول المراد ترسيب ما به من مواد عالقة. تتباين أجهزة الطرد المركزي اليدوية فيما بينها كثيرا من حيث الصنع لكن أبسطها يمتاز برأس يحتوي على أنبوبتي طرد مركزي فقط. تثبت هذه الأجهـزة عادة على أسطح طاولات المعامل بمكابس بسيطة تربط باليد. في وقتنا الحاضر قد لا نحتاج إلى استخدام مثل هذه الأجهزة البدائية، لكن قد تكون ذات أهمية بالغة خلال الرحلات الحقلية وبالذات في المناطق النائية والتي لا يوجد بها مصدر كهربائي (شكل ٥).



شكل ٥ جهاز طرد مركزي يدوي.

أجهزة الطرد المركزي الكهربائية

في الواقع هذه الأجهزة عديدة وتصنف حسب الحجم وسرعة الدوران ونوع رأس جهاز الطرد، لكنها جميعا تشترك في صفة أساسية واحدة وهي أن جهازها الحركي يدار بالتيار الكهربائي. تمتاز هذه الأجهزة بسرعة دوران ثابتة وعالية وتزود بمنظمات للتحكم في عمليات البدء والتوقيف وسرعة الدوران. كما تزود بغطاء محكم الغلق وبالذات أثناء الدوران وهذا لحماية من يقومون بالإشراف على عمليات الفصل. لهذا تعتبر أجهزة الطرد المركزي الكهربائية ذات أهمية بالغة في عمليات الفصل. فبالإمكان ترسيب كميات عالية نسبيا من المواد العالقة في فترات وجيزة وبشكل دقيق. تتباين سرعة الدوران بين هذه الأجهزة لكنها في الغالب تتراوح فيما بين ١٠٠٠ ـ ١٥,٠٠٠ دورة في الدقيقة. يمكن تصنيف هذه الأجهزة إلى الآتي:

ا ـ أجهزة طرد مركزي للطاولة — Bench centrifuges

ب ـ أجهزة طرد مركزي لتحت الطاولة — Sub-Bench centrifuges

جـ ـ أجهزة طرد مركزي كبيرة الحجم — Large centrifuges

د ـ أجهزة طرد مركزي مبردة — Refrigerated centrifuges

أجهزة طرد مركزية للطاولة

مثل هذه الأجهزة يمكن نقلها في أرجاء المعمل بسهولة وعادة توضع على أسطح الطاولات ورفوف المعمل ولذا أطلق عليهم اسم (Bench centrifuges). لهذا تعتبر من أهم الأجهزة المعملية الواجب توفرها في وحدات الأبحاث والمختبرات الجامعية نظرا لأهميتها في عمليات الترسيب والفصل الفوري (شكل ٦).



شكل ٦ جهاز طرد مركزي للطاولة.

أجهزة طرد مركزية لتحت الطاولة

هذا النوع من الأجهزة لا يختلف كثيرا عن الأجهزة سابقة الذكر، لكنها تمتاز بأنها نسبيا أكبر ولهذا تكون عادة أكثر ثباتا. وتستخدم هذه الأجهزة في عمليات الطرد المركزي وترسيب كميات كبيرة لذا توجد عادة في المستشفيات ومعامل تصنيع الأدوية التجارية (شكل ٧).

أجهزة الطرد المركزية كبيرة الحجم

هذه أجهزة طرد مركزية كبيرة وتستخدم في عمليات الفصل لكميات كبيرة قد



شكل ٧ جهاز طرد مركزي تحت الطاولة (الصورة من شركة Heraeus christ GMBH)

تصل إلى ٦ كيلوجرام في آن واحد. وهي بمثابة أجهزة طرد ثقيلة تتراوح أوزانها فيما بين ٢٠٠ إلى ٣٠٠ كيلوجرام (شكل ٨).



شكل ٨ : جهاز طرد كبير الحجم (الصورة من شركة Heraeus christ GMBH)

أجهزة الطرد المركزية المبردة

هذا النوع من الأجهزة يصنف مع أجهزة الطرد المركزي كبيرة الحجم لكنها تنفرد بمميزة خاصة حيث أنها مزودة بجهاز تبريد يثبت درجة حرارة المحلول المراد فصل محتوياته المعلقة. هذه الأجهزة ضرورية عند فصل بعض مكونات المحاليل وبالذات المحاليل التي تتأثر بارتفاع درجة الحرارة التي تنجم عن سرعة الدوران مثل محاليل الدم والمستخلصات البروتينية. لذا يوجد هذا النوع من الأجهزة في المستشفيات وبعض المختبرات العملية المتخصصة.

أجهزة الطرد المركزي هائلة السرعة

يعتبر هذا النوع من الأجهزة من أحدث ما توصل إليه العلم الحديث في مجال الفصل والترسيب حيث بالإمكان الحصول على سرعة دوران عالية جدا قد تصل إلى أكثر من ٠٠٠ , ٥٠ دورة في الدقيقة. مثل هذه السرعة العالية مكنت العلماء والباحثين من فصل مكونات الخلية الدقيقة جدا وبشكل نقي. تمتاز هذه الأجهزة بأن غرفة الدوران (Roter chamber) بالإمكان التحكم في درجة حرارتها وتفريغها من الهواء للحد من ارتفاع درجة الحرارة الناتجة من الدوران السريع. كما تمتاز بضوابط للتحكم في درجة التفرغ، درجة الحرارة، سرعة الدوران وعملية التوقيف. هذه الأجهزة عادة ثقيلة جدا وثابتة ونسبة الارتجاج قد تكون معدومة تماما (شكل ٩).

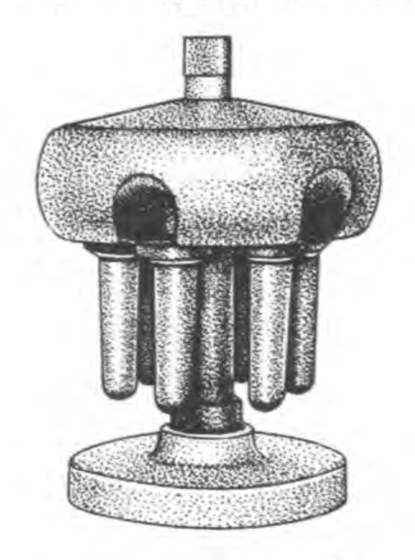
أما نوعية الرؤوس الدوارة لجهاز الطرد في مثل هذه الأجهزة، فهناك ما يعرف بالرأس المتأرجح (Swing out head) والرأس الزاوي (Angle-head) والرأس العمادي (Vertical-head). الرأس المتأرجح تتخذ أنابيب الطرد المركزي وضعا أفقيا أثناء الدوران نظرا لأن كؤوس (Caps) الأنابيب متصلة مع بعضها البعض بمفاصل متحركة (شكل ١٠).

أما الرأس الزاوي فتتخذ أنابيب الطرد المركزي زاوية ثابتة ومحددة أثناء الدورن. وهـذا يضمن سرعة دوران أعلى وبالتالي ترسيب أسرع نظرا لأن المقاومة الناتجة عن

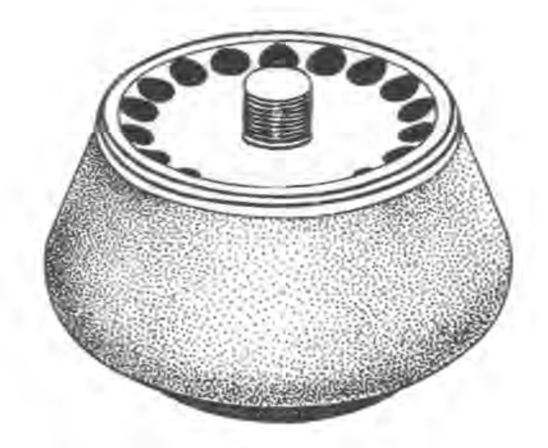
سرعة الدوران تكون أقل عند استعمال مثل هذا النوع من الرؤوس (شكل ١١) وفي حالة الرأس العمادي تكون أنابيب الطرد المركزي دائما رأسية وبشكل عمادي ثابت كما في الشكل (١٢).



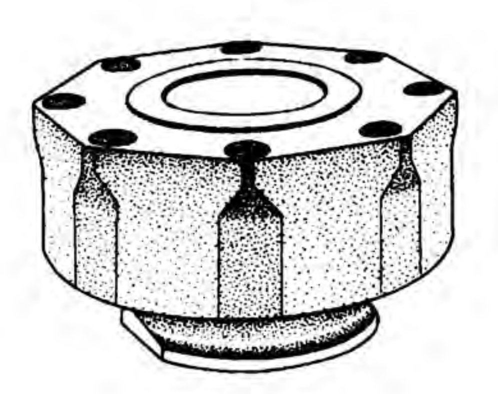
شكل ٩ : جهاز طرد مركزي فائق السرعة.



شكل ١٠ : الرأس المتأرجح.



شكل ١١ : الرأس الزاوي.



شكل ١٢ : الرأس العمادي.

الملحق رقم (٢)

طرق التنظيف

● التنظيف بالمذيبات ● التنظيف بالقلويات ● التنظيف بالحموض ● التنظيف بالموجات فوق الصوتية

إن ظاهرة التلوث (Contamination) لتعتبر من أكبر المشاكل التي تواجه الباحث سواء كان ذلك التلوث بكتيريا (Bacterial) أو كيميائيا (Chemical) ، لهذا يجب أن يبذل جهد كافي في اختيار نوعية المواد والمعدات التي يحتاج لها في هذا المجال. لهذا يجب أن تكون جميع الأدوات المستعملة في مجال التحضيرات المجهرية على درجة عالية من النظافة ويوجد أربع طرق رئيسية لتنظيف مثل هذه الأدوات:

١ ـ التنظيف بالمذيبات	Cleaning with detergents
٢ ـ التنظيف بالقلويات	Cleaning with alkalies
٣ ـ التنظيف بالحموض	Cleaning with acids
٤ ـ التنظيف بالموجات فوق الصوتية	Cleaning with ultrasonic waves

التنظيف بالمذيبات

تستعمل المذيبات الآن على نطاق واسع في مجال التنظيف وبالذات لتنظيف الأوعية البلاستيكية، ولكن يجب معرفة أن مثل هذه المذيبات صعب إزالتها وتحتاج إلى عمليات غسل جيدة بالماء الجاري ولعدة ساعات (٣ ساعات كحد أدنى وليلة كاملة كحد أعلى) وبعدها تغسل بالماء المقطر.

من أهم المذيبات شائعة الاستعمال في الوقت الحاضر المحاليل الآتية:

ا ـ محلول الهيماسول Haemosol
ب ـ محلول السترجين Stergen
جـ ـ محلول الديكون ٧٥ Decon 75
د ـ محلول الميكروسولف Microsolve

أما طريقة التنظيف فتتم حسب الآتي:

١ ـ تترك المعدات في الماء العادي لفترة كافية من الزمن (فترة تخمير) بعدها تزال جميع الأوراق وما شابه ذلك من علامات أو أثار غير مرغوب في وجودها. الجدير بالذكر أن أثار الكتابة ببعض الأنواع من أقلام الشمع قد يصعب إزالتها بالماء ولهذا تحتاج إلى معالجة خاصة مثل غطسها في ماء ساخن به مادة مذيبة وبعدها تمسح جيدا بقطعة من القماش.

٢ ـ تنقل المعدات إلى حوض التنظيف الفعلي والذي يحتوي على المحلول المذيب مثل (Decon 75) وتكون نسبة تخفيف المحلول (١ : ٢٠٠) بالماء مناسبة جدا، لكن يجب عدم استعمال اليدين مباشرة بل يستحسن لبس قفازات المطاط الرقيقة للحفاظ على سلامة اليدين.

يفضل أن تترك المعدات ليلة كاملة ولو أن تركها لمدة ساعتين قد تؤدى الغرض المطلوب إذا كانت تلك المعدات أصلا نظيفة، لكن يجب الغسل الجيد بالفرشاة.

٣ ـ بعد عملية الغسل بالمذيب، يجب إزالة أثار المذيب تماما، وذلك بغسل المعدات تحت حنفية الماء الجاري لعدة ساعات، ويفضل أن يكون هذا الماء مرشحا.

٤ ـ يجب غسل المعدات جيدا بالماء المقطر ثم ترك هذه المعدات لتجف في مكان نظيف خال من ذرات الغبار أو تجفف عند درجة حرارة معتدلة داخل الفرن (Oven).

التنظيف بالقلويات

عملية التنظيف بالقلويات تشبه إلى حد كبير تلك الخطوات المذكورة في التنظيف بالمذيبات، ولكن من أشهر القلويات المناسبة للتنظيف ما يلي:

ا ـ ميتا سيلكات الصوديوم Sodium metacilicate

ب ـ كربونات الصوديوم Sodium carbonate
جـ ـ فوسفات الصوديوم الثلاثية Sodium triphosphate

التنظيف بالحموض

استعمال الحموض مثل حمض الكبريتيك، وحمض الكروم، وحمض النيتريك في عمليات التنظيف أمر شائع ولو أن هناك بعض الأخطار المتوقع حدوثها أثناء استعمال مثل هذه الحموض القوية، زيادة على أنه من الصعب إزالة أثارها من المعدات. يعتبر حمض الكـروم (Chromic acid) من أشهر الحموض المستعملة في الوقت الحاضر في عمليات التنظيف في مجال التحضيرات المجهرية، ويحضر حسب الآتي:

١ ـ يوزن ٤٠ جم من ثنائى كرومات البوتاسيوم.
٢ ـ تذاب الكرومات في كمية قليلة جدا من الماء المقطر.
٣ ـ يضـاف حمض الكبريتيك المركز وبحذر شديد حتى يكتمل الحجم إلى لتر واحد وعندها سوف يكون لون المحلول بنى مصفر.

يجب عدم استعمال المحلول في التنظيف عندما يتحول لون المحلول إلى اللون الأخضر، لكن يجب غسل أثار هذا الحمض من المعدات جيدا قبل الاستعمال.

التنظيف بالموجات فوق الصوتية

حديثا طورت أجهزة دقيقة لتنظيف بعض المعدات الصلبة الدقيقة والحساسة والتي يصعب تنـظيفها بالمحاليل العادية، أو التي تؤثر عليها بعض المحاليل القوية بحيث توضع هذه المعدات داخل جهاز له القدرة على تكوين ذبذبات صوتية ذات تردد عال كفيل بتكسير الشوائب العالقة بهذه المعدات.

الملحق رقم (٣)

أشهر الأصباغ المستعملة في مجال التحضيرات المجهرية

اسم الصبغة		جافة Dry	سائلة Sol.	حيوية Vital	فلورسيتية Fluo.	الوسط pH	المعامل اللوني Colour Index
الأكردين البرتقالي	Acridine orange	+			+	ق	٤٦٠٠٥
أزرق الأنيلين	Aniline blue	+	+			ح	٤٢٧٥٥
آزوكارمين ج	Azo Carmine G	+				ح	٥٠٠٨٥
آزر أ	Azure A	+				—	٥٢٠٠٥
الفاشين القاعدية	Basic fuchsin	+	+		+	ق	٤٢٥٠٠
الفاشين الحمضية	Acid fuchsin	+	+		+	ح	٤٢٦٨٥
الأزرق القطني	Cotton blue		+			ح	٤٢٧٨٠
البنفسج البلورية	Crystal violet	+		+		ق	٤٢٥٥٥
الإيوسين الأزرق	Eosin B	+				ح	٤٥٤٠٠
الإيوسين الأصفر	Eosin Y	+				ح	٤٥٣٨٠
الأخضر السريع	Fast green	+				ح	٤٢٠٥٣
صبغة قمزا	Giemsa stain	+	+			—	—
الهياتوكسلين	Haematoxylin	+				ق	٧٥٢٩٠
دلافيلد	Delafields		+				
أرلنج	Ehrlich's		+				
هارس	Harris		+				
هيدنهان ١	Heidenhain 1		+				
هيدنهان ٢	Heidenhain 2		+				
صبغة لشهان	Leishman's stain	+	+				
أزرق المثيل	Methyl blue	+	+	+	+	ح	٤٢٧٨٠
أخضر المثيل	Methyl green	+	+			—	٤٢٥٨٥
الأحمر الزيتي (و)	Oil red O	+				ح	٢٦١٢٥
البرتقالي (ج)	Orange G	+	+			ح	١٦٢٣٠
الأورسين	Orcein	+				ق	—
أحمر الكنغو	Congo red				+	ح	٢٢١٢٠
الهياتين	Hematein	+				ق	٧٥٢٩٠
أخضر جينس	Jaunus green	+	+	+	+	ق	١١٠٥٠
الأخضر الفاتح	Light green	+	+			ح	٤٢٠٩٥
أزرق لكسول السريع	Luxol fast blue	+				ح	—
الأحمر المتعادل	Neutral red	+	+	+	+	ق	٥٠٠٤٠
الصفرانين	Safranin	+	+	+		ق	٥٠٢٤٠
أسود السودان	Sudan black	+				ح	٢٦١٥٠
سودان ٣	Sudan III	+	+			ح	٢٦١٠٠
سودان ٤	Sudan IV	+				ح	٢٦١٠٥
أزرق التولويدين	Toluidine blue	+	+			ق	٥٢٠٤٠
صبغة رايت	Wright stain	+	+			—	—

ق = قاعدي ح = حمضي

الملحق رقم (٤)

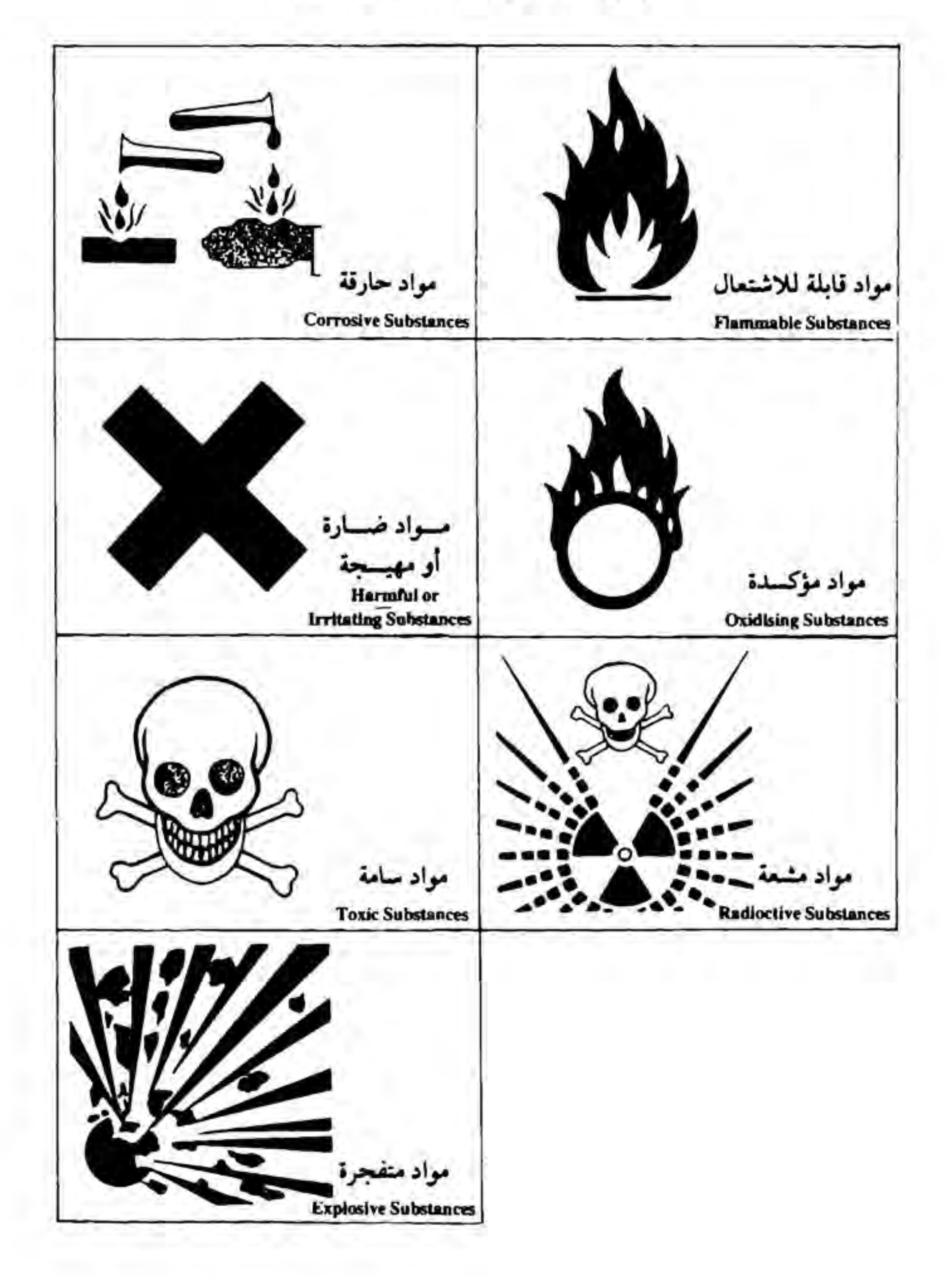
كيفية تحضير محاليل أحادية العيارية

من هيدروكسيد الأمونيوم وبعض الحموض شائعة الاستعمال

اسم المحلول	الوزن الجزئي	النسبة المئوية	الكثافة	حجم/ لتر	مل/ لتر
هيدروكسيد الأمونيوم (NH_4OH)	١٧,٠٣	٢٦	٠,٩٠٤	٢٣٥	٧٢,٤
		٢٨	٠,٨٩٨	٢٥١٠٤	٦٧,٧
		٣٠	٠,٨٩٢	٢٦٧,٦	٦٣,٦
حمض الخليك (CH_3COOH)	٦٠,٠٥	٩٩,٧	١,٠٥٠	١٠٥٠	٥٧,٢
		٩٩	١,٠٥٢	١٠٤٢	٥٧,٦
		٩٨	١,٠٥٥	١٠٣٤	٥٨,٠
حمض الفورميك ($HCOOH$)	٤٦,٠٣	٩٦	١,٢١٧	١١٨٠	٣٩,٣
		٩٨	١,٢١٨	١١٩٤	٣٨,٤
		٩٩	١,٢٢٠	١٢٠٨	٣٨,٠
		١٠٠	١,٢٢١	١٢٢١	٣٧,٦
حمض الهيدروكلوريك (HCl)	٣٦,٤٦	٣٦	١,١٧٩	٤٢٤,٤	٨٥,٩
		٣٨	١,١٩٢	٤٥١,٦	٨٠,٤
		٤٠	١,١٩٨	٤٧٩,٢	٧٦,٠
حمض النتريك (HNO_3)	٦٣,٠٢	٦٩	١,٤٠٩	٩٧٢,٣	٦٤,٨
		٧٠	١,٤١٣	٩٨٩,٤	٦٣,٦
		٧١	١,٤١٨	١٠٠٦,٠	٦٢,٦
		٧٢	١,٤٢٢	١٠٢٤,٠	٦١,٥
حمض الكبريتيك (H_2SO_4)	٩٨,٠٧	٩٥	١,٨٣٤	١٧٤٢	٢٨,١
		٩٦	١,٨٣٥	١٧٦٢	٢٧,٨
		٩٧	١,٨٣٦	١٧٨١	٢٧,٥

الملحق رقم (٥)

رموز التحذير المتعارف عليها دوليا



المراجع

١ - العربية

أبوزنادة، عبدالعزيز حامد و الجوهري، محمود محمد (١٩٨٠). *المجهر والبنيات الدقيقة*. الرياض: جامعة الرياض.

الحاج، حميد أحمد. (١٩٨٢) *المبادىء الأساسية للتحضير المجهري الضوئي*. نيويورك: دار جون وايلي وأولاده.

لطفي، رمسيس والحاج، حميد أحمد. (١٩٨٤) *دليل مختبر التحضير المجهري الضوئي*. نيويورك: دار جون وايلي وأولاده.

٢ - الانجليزية

Anderson, T.F. (1951). Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for electron microscope, *Trans. N.Y. Acad. Sci.* **13:** 130.

Baker, R. (1963). *Cytological Technique*. New York: John Wiley and Sons.

Barer, R.(1968).*Lecture Note on the Use of the Microscope*. Oxford: Blackwell.

Barrnett, R.J., Perney, D.P. and **Hagstrom, P.E.** (1964). Additional new aldehyde fixatives for histochemistry and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, **12:** 36.

Barron, A.L. (1965). *Using the Microscope*. London: Chapman and Hall Ltd.

Bensley, R.R. and **Bensley,S. H.** (1938). *Handbook of Histological and Cytological Technique*. Chicago: Universtiy of Chicago Press.

Bonhag, P.F. (1955). Histochemical studies of the ovarian nurse tissue and oocyte of the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* Dallas. I. Cytology, nucleic acid and carbohydrates. *J. Morphol.*, **96:** 381.

Bradbury, S. (1984). *An Introduction to the Optical Microscope*. Oxford: Oxford Univ. Press.

Bullivant, S. (1970). In: **Parsons, D.F.** (ed.). *Some Techniques in Electron Microscopy,* New York and London: Academic Press.

Bullivant, S. and **Ames, A.** (1966). A simple freeze-fracture replication method for electron microscopy, *J. Cell Biol.* **29:** 435.

Cosslett, V.E.(1966). *Modern Microscopy,* London: Bell.

Culling, C.F.A. (1974). *Modern Microscopy, Elementary Theory and Practice.* Butterworths.

Darlington, C.D. and La Cour, L.F. (1976). *The handling of Chromosomes,* London: George Allen & Unwin Ltd..

Fahrenbach, W.H. (1963). A contribution to glass knife breaking, *J. Cell Biol.* **18:** 475.

Finck, H. (1960). Epoxy resins in electron microscopy, *J. Biophysical and Biochemical Cytolgoy,* **7:** 27.

Frasca, J.M. and **Parks, V.R.** (1965). A routine technique for double-staining ultrathin sections using uranyl and lead salts, *J. Cell Biol.* **25:** 157.

Glauert, A.M. (1974). Fixation, delydration and embedding of biological specimens. In: "*Practical Method in Electron Microscopy*" (**A.M. Glauert,** ed.) Amesterdam: North-Holland Publ.

Glauert, Audrey M. (1977). *Practical Methods in Electron Microscopy*. Amesterdam: North-Holland Publishing Company.

Glauert, A.M. and **Glauert, R.H.** (1958). Araldite as an embedding medium for electron microscopy. *J. Biophysical and Biochemical Cytology,* **4:** 191.

Gomori, G. (1952). *Microscopic Histochemistry*. Chicago: University of Chicago Press.

Grimstone, A.V. (1977). *The Electron Microscope in Biology,* 2nd ed., Edward Arnold.

Grimstone, A.V. and **Skaer, R. J.** (1972). A Guide Book to Microscopical methods. London: Cambridge University Press.

Hallimond, D.F. (1970) *The Polarizing Microscope*. Vickers Instruments, Yorkshine.

Hayat, M.A. (1978). Introduction to Biological Scanning Electron Microscopy. Baltimore, London, Tokyo: University Park Press.

Hayat, M. A. (1981).*Fixation for Electron Microscopy*. New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press.

Humason, G.L. (1972). *Animal Tissue Techniques*. San Francisco: W.H. Freeman Company.

Huxley, H.E. (1957). The double: array of filaments in cross-striated muscle, *J. Biophys. Biochem. Cytol*.3: 631.

Karnovsky, M.J. (1961). Simple method for staining with lead at high pH in electron microscopy, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **11:** 729.

Karnovsky, M.J. (1967) The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J. Cell Biol.* **35:** 213.

Karp, G. (1976). *Cell Biology*. McGraw-Hill Kogakusha, Ltd.

Kessel, R.G. and **Shin, C.Y.** (1974) *Scanning Electron Microscopy in Biology. A Student's Atlas on Biological Organization.* New York: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg .

Kushida, H. (1959). On an epoxy resin embedding method for ultrathin sectioning, *Electron Microscopy* **8:**72.

Latta, H. and **Haytmann, J.F.** (1950). Use of a glass edge in thin sectioning for electron microscopy. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **74:** 438.

Lillie, R. D. (1965). *Histopathological Technic and Partical Histochemistry*. New York: McGraw Hill .

Luft, J.H. (1956). Permanganate - a new fixative for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2:** 799.

Martin, J.H., Lynn, J.A. and **Nickey, W.M.** (1966) A rapid polychrome stain for epoxy-embedded tissues, *Am. J. Clin. Pathol.* **46:** 250.

Millonig, G. (1961). A modified procedure for lead staining of thin sections. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **11:** 736.

Moor, H., Muhethaler, K.,Waldner, H. and **Frey-Wyssling. A.** (1961) A new freezing ultramicrotome. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **10:** 1.

Nass, M.M.K., Nass, S. and **Afzelius. B. A.** (1965). The General occurrence of mitochondrial DNA. *Expth. Cell Res.* **37:** 516.

Ohnsorge, J. and **Holm, R.** (1973). *Scanning Electron Microscopy. An Introduction for Physicians and Biologists.* Stuttgart: Georg Thieme Publishers.

Palade, G.E. (1952). A study of fixation for electron microscopy, *J. Experim. Med.* **95:** 285.

Pantin, C.F.A. (1974). *Notes on Microscopical Technique for Zoologists.* Cambridge: Cambridge University Press.

Pearse, A.G.E. (1960). *Histochemistry: Theoretical and Applied,* J.&A. Churchill Ltd.

Pearse, A.G.E. (1968). *Histochemistry: Theoretical and Applied,* Vol. 1, 3rd ed. J.&A. Churchill Ltd..

Pearse, A.G.E. (1972). *Histochemistry: Theoretical and Applied,* Vol. 2, 3rd ed. Edinburgh and London: Churchill Livingstone.

Prescott, D.M. (1964). Autoradiography with liquid emulsion. In: **(ed. D.M. Prescott),** *Methods in Cell Physiology.* Vol. 1, New York and London: Academic Press.

Price, G.R. and **Schwartz, S.** (1956). Fluorescence microscopy, In: (ed. **G. Oster** and **A.W. Pollisher).** *Physical techniques in Biological Research,* Vol. 3. New York: Academic Press.

Renolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, *J. Cell Biol.* **17:** 208.

Richards, A. G. (1951). *The Integument of Arthropods,* Minneapolis: Minnesota University Press, MN.

Richardson, K.C., Jarrett, L. and **Finke, E. H.** (1960). Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy, *Stain Tech.* **35:** 213.

Rogers, A. W. (1967). *Techniques of Autoradiography.* Elsevier, Amsterdam, New York and London .

Ross, K.F.A. (1967). *Phase Contrast and Interference Microscopy for Cell Biologists,* London: Edward Arnold Ltd.

Sabatini, D.D., Bensch, K. and **Barrnett, R.J.** (1962). New means of fixation for electron microscopy and histochemistry, *Anat. Rec.* **142:** 274.

Sabatini, D.D. Bensch, K. and **Barrnett, R.J.** (1963). Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation, *J. Cell Biol.* **17:** 19.

Sabatini, D.D., Miller, F. and **Barrnett, R.J.** (1964). Aldehyde fixation for morphological preservation and enzyme histochemical studies with electron microscope, *J. Histochem. Cytochem.* **12:** 57.

Singer, M. (1952). Factor which control the staining of tissue sections with acid and basic dyes, *Intern. Rev. Cytol.* **1:** 220.

Sleytr, U.B. and **Robards. A.W.** (1978). Freeze-fracturing: a review of methods and results. In: (**P. Echlin,** ed.)*Low Temperature Biological Microscopy and Microanalysis.* Oxford: The Royal Microscopical Society.

Southworth, H.N. (1975). *Introduction to Modern Microscopy.* London: Wykeham Publications.

Spencer, M. (1982). *Fundamental of Light Microscopy.* Cambridge: Cambridge University Press.

Spurr, A.R. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastructure Research* **41:** 200.

Steere, R. L. (1957). Electron microscopy of structural detail in frozen biological specimens. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3:** 45.

Stempak, J. and **Ward, R.T.** (1964). An improved staining for electron microscopy, *J. Cell Biol.* **22, 297.**

Stolinski, C. and **Breathnach, A.S.** (1975). *Freeze-Fracture Replication of Biological Tissue. Techniques, Interpretation and Applications.* London: Academic Press.

Tribe, M., Erant, M.R. and **Snook, R.** (1975). *Light Microscope.* Cambridge: Cambridge University Press.

Weakley, Brenda S. (1981). *A Beginner's Handbook in Biological Transmission Electron Microscopy* (2nd ed.). Edinburgh, London, Melborne and New York: Churchil Livingstone.

White, G.W. (1966). *Introduction to Microscopy.* London: Butterworth & Co.

Wilson, G.B. and **Morrison, H.** (1977). *Cytology.* East-West Press.

Winkelstein, J.M. Menefee and **Bell, A.** (1963). Basic fushsin as a stain for osmium-fixed, Epon-embedded tissue, *Stain Technol.* **38:**202.

Wischnitzer, Saul (1970). *Introduction to Electron Microscopy, 2nd ed., Pergamon Press.*

Young, R. (1961). Principles and techniques of fluorescence microscopy. *Quarterly J. Micr. Sci.* **102:**419.

كشاف المصطلحات العلمية

أولا : عربي - إنجليزي

أ

د



ط

ع

غ

م

Champy's	شامبي ٢٥٥
Schaudin's	شاودن ٢٥٥
Flemming's	فلمنج ٢٥١
Carnoy's	كارنوى ٢٥٣
Klarke's	كلارك ٢٦٦
Hollande's	هولاندى ٢٥٦
Heidenhain's (Susa)	هيدنهين (سوسا) ٢٥٤
Helly	هيلى ٢٥٢
Fixatives	مثبتات
non-coagulant primary	أولية غير مخثرة ٢٤٦
coagulant primary	مخثرة ٢٤٥
simple	بسيطة ٢٤٦
non-additive	غير مضيفة ٢٤٢
aqueous	مائية ٩٠
mixture	مخلوطة ٢٤٧، ٢٥٠
compound	مركبة ٢٤٦، ٢٤٧، ٢٤٩، ٢٥٠
nuclear	نووية ٢٥٦
Side groups	مجاميع جانبية ٢٤٣
phosphoric	فوسفورية ٢٦٧
Microscopes	مجاهر ١١
Compound microscopes	مركبة ٦، ١٧، ١٨
Transmitted microscopes	نفاذة ١٣٥
Active-groups	مجموعات فعالة ٢٤٣
Microscope	مجهر
simple electron	الكتروني بسيط ١٤٤
modern electron	حديث ١٤٥

ن

و

ي

ثانيا: إنجليزي - عربي

A

Abbe condenser	مكثف آبى
Absolute ethyl alcohol (ethanol)	كحول أثيلي مطلق
Acetic acid	حمض الخليك
Acetic acid/ acetate buffer	محلول حمض الخل / منظم الخلات
Acetic-ethanol	كحول خلي
Aceto-carmine	كارمين خلي
Acetone	أسيتون
Aceto-orcein	أورسين خلى
Achromats	عدسات اللالونية
Acid dyes	أصباغ حمضية
Acid-fuchsin	حمض الفوشين الحمضي
Acidic amino acids	حموض أمينية حمضية
Acidic dyes	أصباغ حمضية
Acidophilic	محبة للصبغات الحمضية
Activated charcoal	فحم منشط
Active-groups	مجموعات فعالة
Air-bubbles	فقاعات هوائية
Alcian blue	أزرق الألشى

Alcoholic Bouin's fixative	مثبت بوان الكحولي
Alkaline phosphatase	إنزيم الفوسفات القلوى
Altmann fixative	مثبت ألتمان
Amino acids	حموض أمينية
Aminopeptidase	إنزيم الأمينو ببتيد
Amoeba	الأميبا
Amphibia	برمائيات
Amphoteric	متذبذب (أمفوتيرى)
Amphoteric dyes	أصباغ متذبذبة (أمفوتيرية)
Ampoules	أمبولات
Anaesthesia	تخدير (غير قاتل)
Angle-head	الرأس الزاوى
Animal testes	خصى حيوانية
Anions	أنيونات (أيونات سالبة)
Annular	حلقي
Annular diaphragm	حجاب حلقي
Annuli	حلقات
Anode	المصعد
Anther	متك
Antibodies	أجسام مضادة
Anura	اللاذيليات
Aplanatic condenser	مكثف لازيغى
Apochromal lenses	عدسات مفرطة لالونية
Apochromatic oil	مفرطة لالونية زيتية
Aqueous fixatives	مثبتات مائية
Aqueous mounting medium	وسط مائي لاصق

Arginine	أرجنين
Arm	ذراع
Aromatic	عطرى
Aromatic hydrocarbon	الهيدروكربونات العطرية
Artifacts	تغيرات مصطنعة
Aspartic acid	حمض الأسبارتيك
Autolysis	تحلل ذاتي
Auxochrome	مساعد تلوين
Avertin	أفرتين
Azare B	آزار ـ ب ـ

B

Bacteria	بكتريا
Balanced saline solution	محلول ملحي متزن
Balbiani	بالبياني
Barier filter	مرشح مانع
Base	قاعدة
Basic amino acids	حوض أمينية قاعدية
Basic dyes	أصباغ قاعدية
Basic fuchin	الفوشين القاعدي
Basophilic	محبة القاعدية
Basophils	قاعدية التفاعل
Beans	فول
Bench centrifuges	أجهزة طرد مركزي للطاولة
Benzene	بنزين
Best's differentiator	مفاضل بست

Binocular microscope	مجهر ثنائي العينية
Biological fluids	سوائل حيوية
Black fringes	أشرطة سوداء
Black granules	حبيبات سوداء
Blade	شفرة
Blood	دم
Blood plasma	بلازما الدم
Blood platelets	صفائح دموية
Blue light	ضوء أزرق
Borax	بوراكس
Borax carmine	صبغة كارمين البوراكس
Bouin's fixative	مثبت بوان
Bright-field microscope	مجهر مضيء الحقل
Brightness	بريق
Brittle	هش
Bromine	برومين
Buchner funnel	قمع بخنر
Buffers	منظمات
Built in illumination	مبنية الإضاءة
Bunsen valve	صمام بنزن
Butanol	بيوتانول «كحول بيوتيلي»

C

Cacodylate buffer	كاكوديليت منظم
Caesalpina	كاسالبينا
Canada balsam	بلسم كندا

Carbonic acid — حمض الكربونيك
Carboxylic acid — حمض الكربوكسيليك
Carboxypeptidase — إنزيم الكربوكسيببتيد
Cardioid — كارديويد
Carmine — كارمين
Carnoy's fixative — مثبت كارنوى
Cathepsin — كاثبسين
Cathode — مهبط
Cathode-ray tube — أنبوبة أشعة المهبط
Cathode sheild — غلاف المهبط (كاثيونات)
Cations — أيونات موجبة
Cavity — تجويف
Cell and tissue cultures — مزارع الخلايا والأنسجة
Cell cultures — مزارع خلوية (خلايا)
Celloidin — سيلويدين
Cells on cover-slips — خلايا مزروعة على أغطية الشرائح
Cellular state — حالة خلوية
Cellular structures — تراكيب خلوية
Cellulose — سليلوز
Central circle — حلقة مركزية
Centrifuge instruments — أجهزة الطرد (الفصل) المركزي
Champ's fixative — مثبت شامبى
Chemical affinity — ترابط كيميائي
Chitin — كيتين
Chitosan — كيتوسان
Chloralhydrate — كلورال هيدرات

Chloramine - T	الكلورامين (ت)
Chloroform	كلوروفورم
Chlorophil	كلوروفيل
Chromatic aberration	زيغ لونى
Chromatic condenser	مكثف لوني
Chromatic corrections	تصحيحات لونية
Chromatophore	حامل لوني
Chromium potassium sulfate	كبريتات البوتاسيوم الكرومية
Chromium trioxide	ثالث أكسيد الكروم
Chromosomes	كروموسومات
Chromotropes	محولات اللون
Chuck	ماسك العينة
Citric acid	حمض الليمون
Cleavage division	الانقسام التفلجي
Clip	ماسك (كلبسة)
Cloudy	عكر
Clove oil	زيت القرنفل
Coagulum	متخثر
Coagulant primary fixatives	مثبتات أولية مخثرة
Coal-gas	غاز الفحم
Coarse control	ضابط خشن
Coating	تغطية ـ طلاء
Coccus	حشرة الكوكس
Cochineal	صبغة القرمز
Collagen	كولاجين
Coloured light filters	مرشحات الضوء الملونة

Compound fixatives	مثبتات مركبة
Compound microscopes	مجاهر مركبة
Concentration	تركيز
Condenser centering screws	لوالب لتوسيط المكثف
Condenser (Control) focus	ضابط المكثف
Condenser lens	عدسة المكثف
Condenser's back lens	عدسة المكثف الخلفية
Condenser's top lens	عدسة المكثف العلوية
Conjugated lipids	دهون متقبضة
Contrast	تباين
Cooling	تبريد
Cooling instruments	أجهزة تبريد
Counter staining	صبغ مضاد
Covalent bonds	روابط تساهمية
Cover-slip	غطاء شريحة
Critical focusing	التبئير الحرج الدقيق
Critical illumination	الإضاءة الحرجة
Critical point drying	طريقة نقطة التحول الحرجة
Crystalline solid	مادة صلبة متبلورة
Culture medium	محلول البيئة
Cuplin jar	جرة كوبلن
Curie (Ci)	وحدة كيورى
Cutting instruments	أجهزة القطع
Cutting knife	سكين القطع
Cytoplasmic inclusions	تراكيب سيتوبلازمية

D

Dark bonds	أشرطة داكنة
Dark-field microscope	مجهر مظلم الحقل
Davidson's fixative	مثبت دافدسون
Deffecting coils	ملفات حارفة
Dehydration	تجفيف (نزع الماء)
Demeric	ثنائيات
Deoxyribonucleic acid (DNA)	حمض نووى ريبوزي لاأكسجيني
Deposits	مخلفات
Depression slide	شريحة مقعرة
Depth of focus	عمق التبئير
Developer	محمض (مظهر)
Devices	عدد
Diamond knife	سكين ماسية
Differentiation	تمايز
Dioxane	الديوكسان
Dipteran larvae	يرقات الحشرات ثنائية الأجنحة
Direct preparation method	طريقة التحضير المباشر
Disc filters	قرص المرشحات
Dishes	أطباق
Disintegrations	تحلل
Dissecting needles	إبر تشريح
Dissecting tools	أدوات التشريح
Distilled water	ماء مقطر
Distorted structures	تشوهات تركيبية
Disulphite wash	غسيل ثنائي الكبريتيت

Dnase	إنزيم الد. ن. أ.
Double fixation	تثبيت مضاعف
Double staining	صبغ ثنائي «مزدوج»
Dry-air method	طريقة الهواء الجاف
Dry-ice maker	جهاز عمل الثلج الجاف
Dry objective lenses	عدسات شيئية جافة
Drive system	جهاز التحريك
Drive wheel	عجلة التحريك
Drosophila	ذبابة الفاكهة (الدروسوفيلا)
Drowning	تغريق
Duboseq-Brasil's fixative	مثبت دوبيك ـ برازيل
Dyes	أصباغ

E

Ehrlich's haemalum	ايرلنج هيماليوم
Electrical centrifuges	أجهزة طرد مركزي كهربائية
Electric balance	ميزان كهربائي
Electric bulbs	مصابيح كهربائية
Electron gun	مدفعة إلكترونية
Electron lens	عدسة إلكترونية
Embedding	طمر
Emulsion	مستحلب
Eosin	الإيوسين
Eosinophil leucocytes	خلايا الدم البيضاء الحمضية
Eosinophils	خلايا حامضية التفاعل
Epithelial cells	خلايا طلائية

Erythrocytes	كرات الدم الحمراء
Ethanol	كحول اثيلي
Ether vapour	أبخرة الإثير
Ethyl acetate	خلات الايثايل
Euglena	يوجلينا
Euparal	الإيوبارال
Euthanasia	تخدير قاتل (رحيم)
Exciter filter	مرشح مهيج
Exit valve	صمام تفريغ
Exposure	فترة تعريض
Extractor fan	مروحة شفط
Extrinsic	خارجية (غير جوهرية)
Eye-lens	عدسة العين
Eye piece	عدسة عينية
Eye-piece tube	أنبوب العدسة العينية

F

Faraday cage	قفص فاراداى
Farrant's medium	بيئة فرانت
Fast green	الأخضر السريع
Ferric ammonium sulphate	كبريتات الأمونيوم الحديدية
Feulgen	فولجن
Fibrin	فبرين
Field diaphragm	حاجز الحقل
Field lens	عدسة الحقل
Field iris	حدقة الحقل

Filament	فتيلة (خيط)
Filter	مرشح
Final image	صورة نهائية
Fine control	ضابط دقيق
Fine forceps	ملقط دقيق
Fixation	تثبيت
Fixatives	مثبتات
Flasks	دوارق
Flat-field lenses	عدسات مستوية الحقل
Flemming's fixative	مثبت فلمنج
Floatation	الطفو
Fluorescence	فلورسين
Fluorescence microscope	مجهر فلورسيني
Fluorescent image	صورة فلورسينية
Fluorite	فلورايت
Fluorite objectives	عدسات شيئية فلوراتية
Focal length	بعد بؤرى
Follicle tips	حويصلات قمية
Forceps	ملاقط
Formaldehyde	فورمالدهيد
Formalin	فورمالين
Formavar	فورمافار
Fragile	قابل للكسر
Free living	حرة المعيشة
Freeze drying	تجفيف مجمد
Freeze etching	نحت المجمدات

Freezing microtomes	ميكروتومات ثلجية
Fresh water invertebrates	حيوانات مياه عذبة لافقارية
Frog	ضفدعة
Front lenses	عدسات أمامية
Fulgen'reaction	تفاعل فولجين
Fum cupboard	خزانة الأبخرة
Fungi	فطريات

G

Gas burner	موقد غازي
Gelatin	جيلاتين
Genetical studies	دراسات وراثية
Gens	جينات
Glacial acetic acid	حمض الخليك الثلجي
Glass knives	سكاكين زجاجية
Glass rod	قضيب زجاجي
Glutamic	حمض الجلوتاميك
Glycerol	الجلسرول
Glycine	الجلايسين (حمض أميني)
Glycogen	النشا الحيواني
Golgi bodies	أجسام جولجى
Granules	حبيبات
Grass-hopper	نطاط الحشائش
Gray and Wess medium	بيئة جراى و وس
Green dye	صبغة خضراء
Grids	شبكات

Groove	تجويف
Gum	صمغ
Arabic	عربي
Damer	دمار
Sandarac	السندروس

H

Haematin	هيماتين
Haematoxylin	هيماتوكسلين
Haemoglobin	هيموجلوبين
Hand centrifuges	أجهزة طرد مركزي يدوية
Hand lens	عدسة اليد
Hand microtomes	ميكروتومات يدوية
Hanging drop method	طريقة القطرة المعلقة
Harelco Synthetic resin	راتنج هارليكو المصنع
Heating instruments	أجهزة التسخين
Heavy baseplate	قاعدة مسطحة ثقيلة
Heidenhain's (Susa) fixative	مثبت هيدنهين (سوسا)
Helly fixative	مثبت هيلى
Hemiptera	حشرات نصفية الأجنحة
Hibernation	بيات شتوى
High eye point	نقطة العين العالية
High power objectives	شيئيات عالية التكبير
High pressure arcs	أقواس الزئبق عالية الضغط
Histidine	هستدين
Histochemical study	دراسة كيمياء الأنسجة

Histoclad	هستوكلاد
Hollande's fixative	مثبت هولاندى
Hot plate	صفيحة ساخنة
Hydrolysis	تميوء
Hydroquinones	هيدروكينون
Hypertonic	محلول زائد التوتر (محلول ذو ضغط انتشاري عال)

I

Illumination source	مصدر الإضاءة
Illumination system	جهاز إضاءة
Immersion method	طريقة الغمس
Incident light	ضوء ساقط
Industrial spirit	كحول صناعي
Inert substance	مادة خاملة
Infiltration of the specimen	تخليل (تشريب) العينة
Interference light microscope	مجهر تداخل الضوء
Intermediate image	صورة متوسطة
Interphase	طور بينى
Intestin	أمعاء
Intrinsic	داخلية (جوهرية)
Invertebrate	لا فقاريات
Inverted microscope	مجهر مقلوب
Iodine	اليود
Iodine-alcohol	كحول يودي
Ion getting pump	مضخة الأيونات
Ionic bonds	روابط أيونية

Ions	أيونات
Iris diaphragm	حجاب حدقي
Iron alum	الشب الحديدي
Isopropanol	كحول أيزوبروبيلي
Isotonic	متساوى التوتر (متساوية الضغط الأزموزي)

K

Kaiser glycerine jelly	جيلاتين الجلسرين القيصري
Klarke's fixative	مثبت كلارك
Kleermount	كليرماونت
Kodak	كواداك
Kohler illumination	إضاءة كوهلير
Knife (Knives)	سكين (سكاكين)

L

Label	مرقم (معلم)
Labelled compounds	مواد (مركبات) مرقمة
Labelling	ترقيم (تعليم)
Lactic acid	حمض اللبن
Lamp	مصباح (لمبة)
Large centrifuges	أجهزة طرد مركزي كبيرة
Lead stain	صبغة الرصاص
Leeuwenhock microscope	مجهر لوفينهوك
Legnin test	الكشف عن اللجنين
Leishmann dye	صبغة لشمان
Lenses	عدسات

Lenses paper	ورق عدسات
Leucocytes	كرات الدم البيضاء
Light bands	أشرطة شفافة
Light green	الأخضر الفاتح
Light intensity	شدة الإضاءة
Light lens	عدسة الضوء
Light-tight boxes	صناديق مانعة للضوء
Limiting diaphragm	حجاب محدد
Linear magnificant	التكبير الطولي
Lipids	دهون
Liquid	سائل
Liquid emulsion	مستحلب سائل
Liquid nitrogen	سائل النتروجين
Living micro-organism	كائن حي مجهري
Locust	جراد
Locust ringer	محلول الجراد المتزن
Low-power objectives	شيئيات منخفضة التكبير
Low voltage	فولت منخفض
Lycopene	ليكوبين
Lymphocytes	خلايا لمفية
Lysine	الليسين (حمض أميني)

M

Magnification instrument	جهاز التكبير
Magnifier	مكبرات
Malignant cells	خلايا سرطانية

Main lens	عدسة أساسية
Mains lead	موصل التيار الرئيسي
Mallory dye	صبغة مالورى
Marine animals	حيوانات بحرية
Masked lipids	دهون مغلفة
Mayer albumen	زلال «ألبيومين» ماير
Mayer's haemalum	صبغة مايرهيماليم
Mechanical stage	مسرح ألى
Meiosis	انقسام اختزالي
Menthol	منثول
Mercuric chloride	كلوريد الزئبق
Mercuric iodide	يوديد الزئبق
Merthiolate	مرثيولات
Metachromosa	ميتاكروموزا
Metachromasy	تحول لوني
Methachromic dyes	أصباغ متغيرة اللون
Methacrylate	ميتاأكريلات
Methelene blue	أزرق المثيلين
Methyl blue	أزرق المثيل
Methyl green	أخضر المثيل
Methyl green/pyronin technique	طريقة أخضر المثيل والبيرونين
Metol	ميتول
Microcurie	ميكروكيورى
Microscopical technique	التحضيرات المجهرية
Microscopic slides	شرائح مجهرية
Microtomes	ميكروتومات

Microtomy	تقطيع
Millipore	ورق ترشيح دقيق الثقوب
Mitochondria	أجسام سبحية
Mitosis	انقسام غير مباشر
Mixture fixatives	مثبتات مخلوطة
Modern electron microscope	مجهر الكتروني حديث
Mold growth	نمو الفطريات
Monocular microscope	مجهر وحيد العينية
Monocytes	نوع من كريات الدم البيضاء
Monosaccharides	سكريات أحادية
Mounting	تحميل
Mounting media	بيئات اللصق
Mounting and movement system	جهاز التخزين والحمل
Movement controls	ضوابط التحريك
Mucopolysaccharide	سكريات عديدة مخاطية
Mucous cells	خلايا مخاطية
Multiple staining	صبغ عديد
Muscle injection	حقن في عضلات الفخذ

N

Nacrotization	تخدير
Namount	ناමونت
Nanometer (nm)	نانومتر
Natural dyes	أصباغ طبيعية
Natural resin	راتنج طبيعي
Negative phase contrast	طور التباين السالب

Microtomy	تقطيع
Millipore	ورق ترشيح دقيق الثقوب
Mitochondria	أجسام سبحية
Mitosis	انقسام غير مباشر
Mixture fixatives	مثبتات مخلوطة
Modern electron microscope	مجهر الكتروني حديث
Mold growth	نمو الفطريات
Monocular microscope	مجهر وحيد العينية
Monocytes	نوع من كريات الدم البيضاء
Monosaccharides	سكريات أحادية
Mounting	تحميل
Mounting media	بيئات اللصق
Mounting and movement system	جهاز التخزين والحمل
Movement controls	ضوابط التحريك
Mucopolysaccharide	سكريات عديدة مخاطية
Mucous cells	خلايا مخاطية
Multiple staining	صبغ عديد
Muscle injection	حقن في عضلات الفخذ

N

Nacrotization	تخدير
Namount	نامونت
Nanometer (nm)	نانومتر
Natural dyes	أصباغ طبيعية
Natural resin	راتنج طبيعي
Negative phase contrast	طور التباين السالب

Negative staining	صبغة سالبة
Negative type	النوع السالب
Nelsonian illumination	اضاءة نلسونية
Neutral dyes	أصباغ متعادلة
Neutral salt	ملح متعادل
Neutrophils	خلايا متعادلة
Newt	النيوت (حيوان)
Ninhydrin-Schiff method	طريقة شف ننهيدرين
Nitrocellulose	نتروسيليلوز
Non-additive fixatives	مثبتات غير مضيفة
Non-coagulant primary fixatives	مثبتات أولية غير مخثرة
Nose-peice	قطعة أنفية
Nuclear fixatives	مثبتات نووية
Nuclear pore	ثقب نووى
Nucleic acids	حموض نووية
Nucleolus	نووية
Nucleo-proteins	بروتينات نووية
Numerical aperture	فتحة عددية

O

Objective beam	شعاع شيىء
Objective lenses	عدسات شيئية
Ocular lenses	عدسات عينية
Oil	زيت
Oil-immersion objectives	زيت عدسات شيئية
Oil-objective lenses	عدسات شيئية زيتية

Oil of eucoluptus	زيت الأوكالبتوس
Oligosaccharies	سكريات مضاعفة
Onion	بصل
Operative procedures	عمليات جراحية
Optimum	مثالي (مثلى)
Optiphor	مبصار
Orange G	صبغة البرتقال (ج)
Osmium tetroxide	رابع أكسيد الأوزمويوم
Osmotic pressure	ضغط أسموزى
Oven	فرن
Over-night	ليلة كاملة

P

Paraboloid	بارابولويد
Paraffin	برافين
Paraffin sections	قطاعات برافينية
Paraformaldehyde	بارافورمالدهيد
Paraldehyde	بارالدهيد
Paramecium	برامسيوم
Parasitic living	طفيلية المعيشة
Penicillin	بنسلين
Performic acid	حمض البيرفورميك
Periodic acid	حمض البيريوديك
Permanent	مستديم
Permanent slide	شريحة مستديمة
Permeability	نفاذية

Permount	برماونت (مادة لتحميل الشرائح)
Perpendicular	متعامد
Phase change	تغير الطور
Phase contrast microscope	مجهر الطور المتباين
Phase of the light waves	طور موجات الضوء
Phase plate	صفيحة الطور
Phenol	فينول
Phloroglucin	فلوروجلوسين
pH-meter insturments	أجهزة قياس الأس الهيدروجيني
Phosphate buffer	محلول الفوسفات المنظم
Phosphorescence	فسفورية
Phosphoric acid	حمض الفوسفور
Phosphoric groups	مجاميع فوسفورية
Phosphotungstic acid	حمض الفسفوتنجستيك
Photographic film	فلم تصوير حساس
Photomicroscopy	تصوير مجهري
Photomultiplier	مضاعف ضوئي
Photosynthesis	عملية التركيب الضوئي
Physiological studies	دراسات فسيولوجية
Piccolyte	بيكوليت
Picric acid	حمض البكريك
Pinthing	تخنيع
Planoapochromats	عدسات مفرطة اللالونية المستوية
Planochromats	عدسات لونية مستوية
Plano-convex lens	عدسة محدبة مستوية
Plant fungi	فطريات نباتية

Plastic	بلاستيك
Pocket lens	عدسة الجيب
Pole piecies	قطع قطبية
Polymers	متبلمرات
Polysaccharides	عديدات التسكر
Polytene chromosomes	كرموسومات بولتينية
Polyvinyl alcohol (DVA)	كحول البوليفينايل
Positive phase contrast	طور التباين الموجب
Positive staining	صبغة موجبة
Positive type	النوع الموجب
Potassium alum	الشب البوتاسي
Potassium bromide	بروميد البوتاسيوم
Potassium dichromate	ثاني كرومات البوتاسيوم
Potassium permenganate	برمنجنات البوتاسيوم
Preservaslide	بريزرفاسلايد
Preservative	مادة حافظة
Primary fixative	مثبت أولي
Primary image	صورة أولية
Progressive dyeing	صبغ متدرج
Projector lens	عدسة مجسمة
Proteinase	إنزيم البروتين
Pro-Texx	بروتكس
Protoplasm	بروتوبلازم
Protozoa	حيوانات أولية
Pyronin	بيرونين

Q

Quantitative studies	دراسات كمية
Quartz halogen	كوارتز هالوجيني

R

Radioactive isotopes	نظائر مشعة
Ramsden circle	دائرة رامسدن
Real image	صورة حقيقية
Rectum	المستقيم
Red blood cells	خلايا الدم الحمراء
Reducing bath	حمام الاختزال
Reference beam	شعاع دال
Refractive index	معامل الانكسار
Refrigerated centrifuges	أجهزة طرد مركزي مبردة
Refrigerator	ثلاجة
Regressive dying	صبغ رجعي
Relative retardation	إعاقة نسبية
Replica	قوالب
Reptiles	زواحف
Resolving power	قدرة التبيين
Resin	التراتنج
Ribbons	أشرطة
Ribonucleoprotein	بروتينات نووية ريبوزية
Rigor mortis	تيبس جسدي
RNA	حمض نووى ريبوزي الـ(ر. ن. أ)
Rossman's fixative	مثبت روسمان

Rotar chamber	غرفة الدوران
Rotary microtomes	ميكروتومات دوارة
Rotating wheel	عجلة دوارة
Rubber stopper	غطاء مطاطي

S

Safranin	سفرانين
Saline solution	محلول ملحي متزن
Salivary gland cells	خلايا الغدد اللعابية
Salts	أملاح
Sanfelice's fixative	مثبت سانفيليس
Scalpels	مشارط
Scanning electron microscope	المجهر الإلكتروني المساح
Schaudin's fixative	مثبت شاودن
Schiff's reagent	محلول شف
Schultz's solution	محلول شلوتز
Scintillator	الوماض (المتلألىء)
Sea water	ماء البحر
Secretory vesicles	حويصلات إفرازية
Section adjustment	ضابط القطاعات
Sectioning of the specimen	تقطيع العينة
Seissors	مقصات
Semiapochromatic	عدسات نصف مفرطة اللالونية
Serra's fixative	مثبت سيرا
Sex chromatin	كروماتين الجنس
Shadowing	تضليل

Sharp blades	شفرات حادة
Sharping	شحذ (سن)
Shrinkage	انكماش
Side-groups	مجاميع جانبية
Silica gel	سيليكا جيلاتينية
Silver conducting paint	طلاء الفضة الموصل
Simple electron microscope	مجهر إلكتروني بسيط
Simple fixatives	مثبتات بسيطة
Simple proteins	بروتينات بسيطة
Simple staining	صبغ بسيط
Single stage replica	قوالب ذات الطور الواحد
Slaughtering	ذبح
Sliding window	نافذة إنزلاقية
Smearing method	طريقة السحب
Sodium-B-glycerophosphate	فوسفات الصوديوم الجلسرينية
Sodium bicarbonate	بيكربونات الصوديوم
Sodium carbonate	كربونات الصوديوم
Sodium diethyl barbiturate	باربتيوريت الصوديوم ثنائية الإثيل
Sodium iodate	أيودات الصوديوم
Sodium nembutal	نمبيوتال الصوديوم
Sodium (or potossium) metabisulphite	ميتاكبريتيتات الصوديوم أو البوتاسيوم الثنائية
Sodium salicylate	سالسيلات الصوديوم
Sodium sulphite	كبريتيت الصوديوم
Sodium thiosulphate	ثيوكبريتات الصوديوم
Soft	رخـــو

عينات لينة (رخوة)	Soft specimens
عامل تقوية	Soldifying agent
نشاط نوعي	Specific activity
صبغ متخصص	Specific staining
مساك (حامل) العينة	Specimen holder
عينات	Specimens
مسرح العينة	Specimen stage
حامل العينات	Specimen stups
زيغ كروى	Spherical aberration
موقد كحولي	Spirit burner
فصل (تفكيك)	Splitting
شبكة أسفنجية	Spong-work
زنبرك	Spring
راتنج سبر	Spurr's resin
خلايا حرشفية	Squamous cells
هرس	Squash
ثابت	Stable
مسرح	Stage
الكشف عن النشا	Starch test
عملية الصبغ	Staining
أجهزة الصبغ	Staining instruments
فلم شريطي	Stripping film
شرائح مطلية	Subbed slides
أجهزة طرد مركزي للتحت الطولة	Sub-bench centrifuges
مكثف تحت مسرحي	Substage condenser
بيئية	Substrate

Substrate preparation	تحضير البيئة
Sudan Black	أسود سودان
Swelling	انتفاخ
Swing out head	الرأس المتأرجح
Syringe	محقن
Synthetic or compoud dyes	أصباغ مصنعة أو مركبة
Synthetic resin	راتنج مصنع

T

Table lens	عدسة الطاولة
Telescope	منظار
Terrestrial vertebrate	حيوانات فقرية أرضية
Tertiary butyl alcohol	كحول البيوتيل الثلاثي
Testis	خصى
Testis follicles	حويصلات الخصية
Thin section	قطاع رفيع
Thionyl chloride	كلوريد الثيونايل
Third instar larva	طور يرقي ثالث
Three dimentional view	منظر ثلاثي الأبعاد
Thymol	ثيمول
Thymidine	ثيمدين
Tissue extracts	مستخلصات نسيجية
Tissue state	حالة نسيجية
Tjio's fixative	مثبت تيجو
Toluene	تلوين
Toluidine blue	أزرق التلويدين

Torch magnifier	مصباح مكبر
Transformer circuit	دائرة المحول
Transmitted fluorescence microscope	مجهر فلورسيني نفاذ
Transmitted light	ضوء نافذ
Transmitted microscopes	مجاهر نفاذة
Trichloracetic acid	حمض الخليك ثلاثي الكلور
Trimmer	مشذب (مهذب)
Trimming	تشذيب
Tris buffer	محلول الترس المنظم
Tritiated thymidine	تيمدين مشعع بالتريتيوم
Tritiated uridine	يوريدين مشعع بالتريتيوم
Tritium	تريتيوم
Trough	حوض
Trypsin (enzyme)	إنزيم التريسين
Tube	أنبوب
Tungsten filaments	خيوط تنجستينية
Two laterally separated beams	شعاعان منفصلان جانبيان
Two lobes	فصين
Two-stage replica	قوالب ثنائية الطور

U

Ultra-centrifuges	أجهزة طرد مركزي هائل
Ultra microtomes	ميكروتومات دقيقة
Ultra-thin sections	قطاعات رقيقة
Ultra-violet light	أشعة فوق بنفسجية
Unicelluar micro-organisms	كائنات مجهرية وحيدة الخلية

Unit of radioactivity	وحدة الإشعاع
Uranyl acetate	خلات أليورانيل
Urethane	يورثين
Urodele	الذيليات

V

Vacuum	مفرغ
Vacuum evaporator	جهاز التبخير المفرغ
Vacuum pump	جهاز تفريغ
Vantegham ring	حلقة فانتيجام
Vaselline	فازلين
Vertebrate animals	حيوانات فقارية
Vertical head	رأس عمادى
Very small specimens	عينات صغيرة جدا
Vibration	تذبذب
View field	حقل الرؤية
Virtual image	صورة خيالية معتدلة
Volatile	متطاير

W

Washing bottle	زجاجة غسيل
Washing instruments	أجهزة غسيل
Watch-maker lens (Loupe lens)	عدسة الساعاتي
Water bath	حمام مائي
White blood cells	خلايا الدم البيضاء

X

Xenon high pressure arcs	أقواس الزينون عالية الضغط
Xylene	زيلين

Y

Yeast	خميرة
Yellow amonium sulphide	كبريتيد الأمونيوم الأصفر

Z

Zenker's fixative	مثبت زنكر
Zephiran	زيفران

الدكتور محمد بن صالح الخليفة

* وُلِدَ عام ١٣٦٧هـ في الشنانة بمنطقة القصيم بالمملكة العربية السعودية، حيث تلقى تعليمه الإبتدائي ثم انتقل إلى مدينة الرس فأكمل تعليمه المتوسط.
* حصل على شهادة الثانوية العامة من مدرسة اليمامة الثانوية بالرياض، ثم التحق بجامعة الملك سعود (الرياض سابقًا) وحصل على درجة البكالوريوس في العلوم (تخصص حيوان ـ كيمياء) عام ١٣٩١هـ.
* عمل معيدًا بقسم علم الحيوان بجامعة الملك سعود. حصل على الدكتوراة في بيولوجيا وفسيولوجيا الحشرات من جامعة ويلز ـ سوانزى في المملكة المتحدة سنة ١٣٩٧هـ.
* عُيِّنَ وكيلاً لعمادة شؤون المكتبات في الفترة من ١٤٠١ ـ ١٤٠٥هـ، ويشغل حاليًا وظيفة أستاذ بقسم علم الحيوان.
* يقوم بتدريس عدة مقررات في قسم علم الحيوان من بينها تقنية المجاهر الضوئية والإلكترونية وفسيولوجيا الخلية.
* شارك في تأليف كتاب الأحياء التكميلي للكليات المتوسطة ـ وزارة المعارف.
* قام بنشر خمسة وعشرين بحثًا في مجال تركيب ووظيفة الخلية والبيئة.
* شارك في كثير من الندوات العلمية داخل وخارج المملكة.
* حضر بعض الكورسات التدريبية في مجال المجاهر الإلكترونية وتقنياتها خارج المملكة.

الدكتور عبدالعزيز بن عبدالرحمن الصالح

* وُلِدَ عام ١٣٦٨هـ في القصب بالمملكة العربية السعودية حيث تلقى تعليمه الإبتدائي ثم انتقل إلى الرياض وأكمل تعليمه المتوسط والثانوي والجامعي.
* حصل على درجة البكالوريوس في علم الحيوان والنبات عام ١٣٩٢هـ من جامعة الملك سعود (جامعة الرياض سابقًا).
* عمل معيدًا بقسم علم الحيوان عام ١٣٩٢هـ.
* حصل على درجة الدكتوراه في علم الخلية وزراعة الخلايا والأنسجة من جامعة سانت أندروس في بريطانيا عام ١٣٩٨هـ.
* عُيِّنَ أستاذًا مساعدًا ثم أستاذًا مشاركًا فأستاذًا بجامعة الملك سعود، كلية العلوم، قسم علم الحيوان.
* عُيِّنَ رئيسًا لقسم علم الحيوان، جامعة الملك سعود خلال العامين ١٤٠٥هـ و ١٤٠٦هـ.
* يقوم بتدريس العديد من المقررات على مستوى البكالوريوس والماجستير ومنها علم الخلية، وعلم زراعة الخلايا والأنسجة، وعلم التقنية، وعلم التحضيرات المجهرية.
* قام بنشر العديد من البحوث في مجال علوم الخلية.
* عضو في الجمعية السعودية لعلوم الحياة، وجمعية نيويورك للعلوم الأكاديمية، وجمعية علماء الوراثة اليابانية، وجمعية علم الأحياء التجريبي في بريطانيا.
* حضر وشارك في عدة مؤتمرات وندوات علمية محلية وعالمية.